

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de la sucrose synthase dans la racine de *Cihorium intybus* L.

Delpierre, Alexia

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SUCROSE SYNTHASE DANS LA RACINE
DE *CIHORUM INTYBUS L.***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Alexia DELPIERRE

Juin 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joellejonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Contribution à l'étude de la sucrose synthase
dans la racine de *Cichorium intybus* L.
DELPIERRE Alexia

Résumé

La sucrose synthase (SuSy) est une enzyme qui catalyse la réaction réversible de dégradation du saccharose en présence d'UDP, formant ainsi de l'UDP-glucose et du fructose. Impliquée dans la synthèse de cellulose et d'amidon, la SuSy existe sous de nombreuses isoformes de fonctions spécialisées et/ou dont les schémas d'expression varient tant au niveau des tissus que de leurs stades de développement. Ces différentes fonctions vont de pair avec une localisation subcellulaire variée. Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche visant à déterminer le rôle de la SuSy dans la racine de chicorée (*Cichorium intybus* L.) et plus particulièrement, à vérifier sa possible implication dans la synthèse d'inuline. Nous avons localisé la SuSy « *in situ* », par le marquage de « tissue-prints » de racine de chicorée, à l'aide d'un polysérum de lapin dirigé contre une forme recombinante de SuSy d'*Arabidopsis*. Après différentes mises au point, ce marquage nous a permis d'observer la présence de SuSy sur toute la surface de la racine de chicorée et pas uniquement au niveau des zones de déchargement du phloème, ce qui corrobore notre hypothèse d'une implication de la SuSy dans la synthèse d'inuline. Les premières étapes d'une construction ARN interférent visant à abolir l'expression de la SuSy dans la racine de chicorée ont également été effectuées de manière à vérifier l'impact d'une absence de SuSy sur la synthèse d'inuline de chicorées transgéniques.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

Promoteur: P. Van Cutsem

Ce travail touchant à sa fin, je tiens à remercier particulièrement

Monsieur le Professeur Johan Messiaen pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire,

Monsieur le Professeur Pierre Van Cutsem pour avoir accepté la direction de ce travail

Madame le Docteur Françoise Liners pour m'avoir guidée tout au long de ce mémoire, pour ses conseils et ses corrections.

Merci à Madame Sandrine Léonard, Messieurs Philippe Coppe, Johan Messiaen et Gérard Trausch, membres du jury de lire ce travail et de prendre part à sa critique.

Merci à toute l'équipe du département de Biologie Végétale et particulièrement à Catherine Demazy et Nicolas Dauchot pour leur aide précieuse ainsi qu'à Pierre pour sa sympathie et son dévouement.

Merci à Françoise Lonnoy pour ses idées et ses compétences informatiques.

Merci à Céline, Vanessa, Vincent et Yves pour ces quelques mois passés dans ce même bateau.

Merci à Anne-Lise, Audrey, Catherine et Gene pour ces années de vie commune, dont je garderai longtemps les souvenirs, merci particulièrement à Gene pour sa complicité et son amitié infinie.

Ce mémoire représentant le point final de mes études, j'aimerais remercier de tout cœur mes parents qui, depuis ma première classe, m'ont toujours soutenue et encouragée ; eux qui, dans les moments de bonheur et surtout dans les autres ont toujours été aux premières loges. Merci pour tout.

Enfin, merci à Valéry pour sa tendresse, sa patience, son soutien et son incompréhension totale de la biologie...

Alexia

Table des matières.

I.	INTRODUCTION.....	1
I.1	LE SACCHAROSE DANS LA PLANTE.....	1
I.1.1	Synthèse du saccharose.....	1
I.1.2	Dégradation du saccharose.....	2
I.2	CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DE LA SUCROSE SYNTHASE.....	3
I.3	LOCALISATION DE L'ACTIVITE SUCROSE SYNTHASE.....	3
I.3.1	Dans les organes consommateurs :	3
I.3.2	Au niveau du phloème :	4
I.4	ROLES DE SUSY	4
I.4.1	Rôle de la SuSy dans la synthèse des polysaccharides pariétaux.	4
I.4.2	Rôle de la SuSy dans la synthèse d'amidon.....	5
I.4.3	Rôle de la SuSy dans la nodulation chez les légumineuse.....	5
I.4.4	Rôle de la SuSy au niveau des tonoplastes.....	6
I.5	ISOFORMES DE LA SUCROSE SYNTHASE.....	7
I.6	SUSY EN CONDITION DE STRESS.....	8
I.7	Phosphorylation de la sucrose synthase.....	9
I.8	SUCROSE SYNTHASE CHEZ CICHORIUM INTYBUS	11
I.9	Immunolocalisation de la sucrose synthase	13
I.10	Generation de mutants susy	14
I.11	L'ARN interférent.....	15
I.12	OBJECTIFS DE CE MEMOIRE.....	17
II.	MATERIEL ET METHODES	18
II.1	Marquage de « tissus Prints »	18
II.2	Préparation des milieux	19
II.3	Préparation de stocks de bactéries	19
II.4	Expression de SuSy et d'UDP-glucose déshydrogénase en bactéries.....	19
II.5	Extraction protéique.....	19
II.6	Culture de bactérie pour isoler la protéine d'intérêt par le « T7-Tag affinity purification kit » (Novagen).....	20
II.7	Extraction des protéines contenues dans les corps d'inclusion.....	20
II.8	Purification des protéines avec le « T7-Tag Affinity Purification Kit ».....	21
II.9	Analyse des protéines par electrophorèse en gel SDS-PAGE (méthode de Laemmli) .	21
II.10	Dosage des protéines par le « Kit NanoOrange Protein Quantification »	22
II.11	Fixation de fragments de racine de chicorée	23
II.12	Marquage de coupes de racines de chicorée.....	23
II.13	Purification des Ac anti-UDP-glucose déshydrogénase	24
II.14	Dosage des Ac purifiés	24
II.15	Amplification du produit de 90 pb avec les amorces SSARNi FOR et SSARNi REV	24
II.16	Purification de cet insert en vue du clonage	25
II.17	Restriction du fragment RNAi SS par les enzymes AscI et SmaI	25
II.18	Ligation du fragment SSRNAi dans le vecteur pCRII	25
II.19	Mini-prep du plasmide pFGC5941	25
II.20	Restrictions vérificatives du vecteur pFGC5941	26
II.21	Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose.....	26
II.22	Précipitation phénol/chloroforme de l'ADN.....	27
II.23	Ligation du fragment RNAi dans le vecteur pFGC5941 par le « Quick Ligation Kit » (NEB)	27

II.24 Transformation de bactéries TOP 10F' par choc thermique	27
III. RESULTATS	28
III.1 Immunolocalisation de SuSy dans la racine de chicorée.	28
III.1.1 Tissue-print de la sucrose synthase.	28
III.1.2 Localisation de SuSy par la immunofluorescence.	32
III.2 Localisation de l'UDP-glucose déshydrogénase (UDPGDH)	33
III.2.1 Purification des anticorps anti-UDP-glucose déshydrogénase.....	33
III.3 Biologie Moléculaire.....	34
III.3.1 Construction d'ARN interférent.....	34
IV. DISCUSSION	40
V. BIBLIOGRAPHIE	43

TABLE DES ABREVIATIONS

1-FFT : fructane 1-fructosyltransférase
1-SSR : sucrose 1-fructosyltransférase
Ac : anticorps
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
ADP-G : ADP-glucose
Ag : antigène
AGPase: ADP-glucose pyrophosphorylase
APS : amonium persulfate
ARN : acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
ATP: adenosine triphosphate
BSA: Bovine serum albumin
ECL: enhanced chemiluminescence
G1P: Glucose 1-phosphate
G6-P: Glucose 6-phosphate
Hexoses-P: Hexoses phosphates
IPTG: isopropyl- β -D-thiocalactoside
kDa: kilodalton
M: molaire
ml: millilitre
mM: milimolaire
PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide
Pb : paires de bases
PBS : phosphate buffered saline
Pi : phosphate inorganique
PM : poids moléculaire
PVDF : polyvynil pyrophosphate
Rpm : rotation par minute
SDS : dodécylsulfate de sodium
SPS : sucrose phosphate synthase
SuSy : sucrose synthase
TBS : tris buffer saline
TBST : tris buffer saline tween
TEMED : N,N,N',N'-tetraméthyl-éthylènediamide
UDP : uridine diphosphate
UDP-G : UDP-glucose
UV : ultra-violet
V : volts

INTRODUCTION

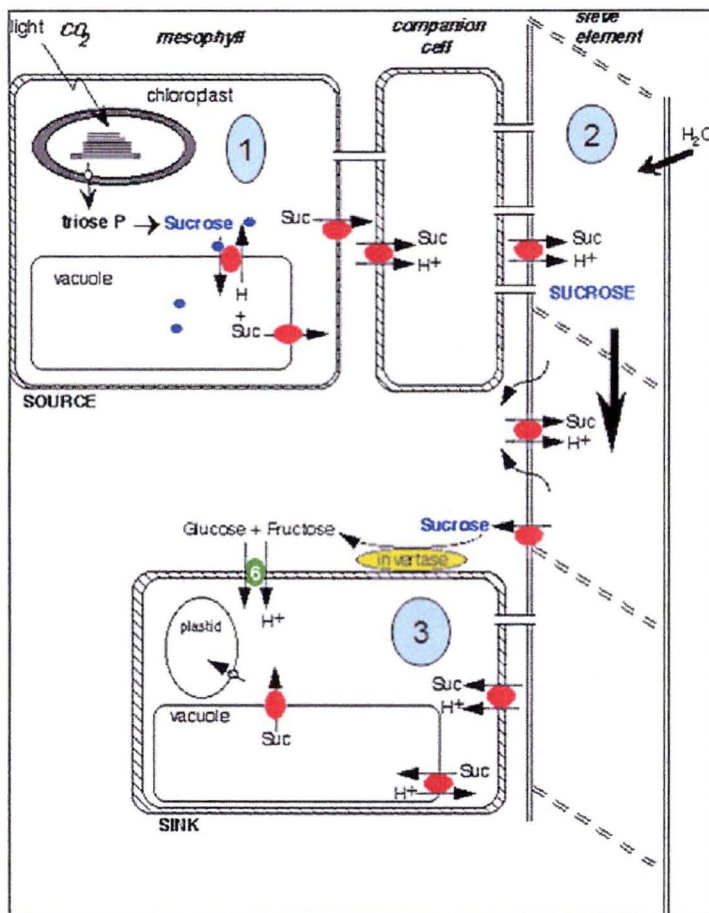


Figure 1 : Synthèse et transport du sucrose dans la plante (1) Fixation du carbone dans les organes photosynthétisants et synthèse du sucrose qui est soit stocké dans la vacuole, soit (2) transporté vers les organes consommateurs, hétérotrophes, par l'intermédiaire du phloème. Au niveau de ces organes consommateurs (3), le sucrose est utilisé pour le maintien du métabolisme, la synthèse de la paroi cellulaire ou pour être stocké (d'après Lalonde *et al.*, 1999)

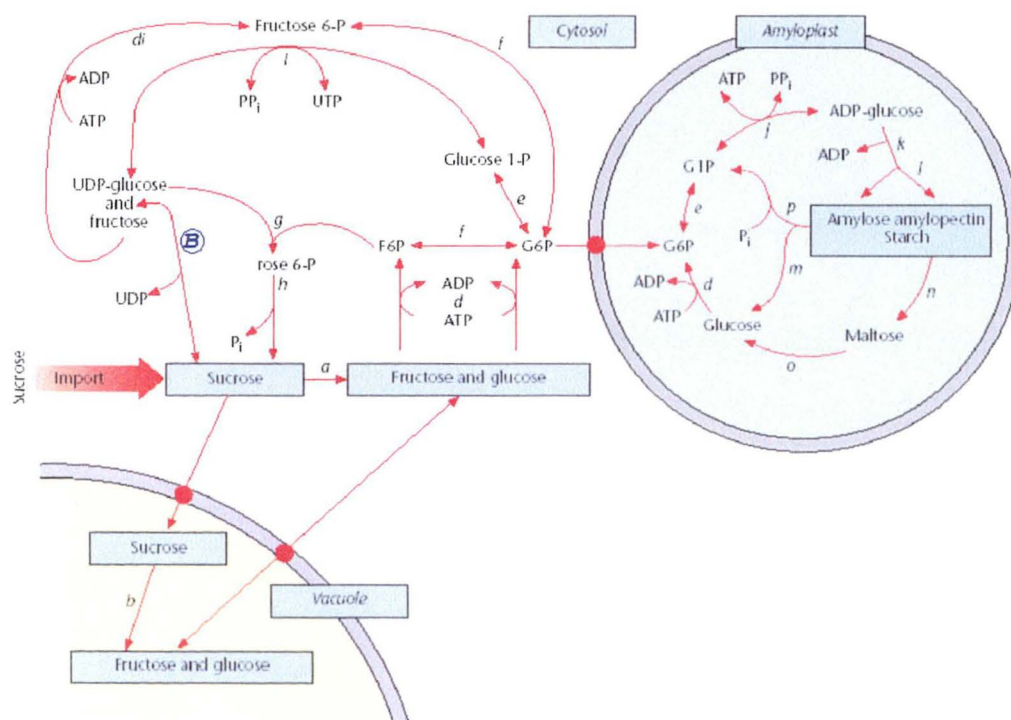


Figure 2 : Métabolisme des sucres dans les cellules des organes consommateurs. Les différentes enzymes impliquées : a, l'invertase alcaline ; **B**, la *sucrose synthase* ; c, l'invertase acide ; d, les hexokinases (glucokinase et fructokinase) ; e, phosphoglucomutase ; f, phosphoglucose isomérase ; g, sucrose-phosphate synthase ; h, sucrose-phosphate phosphatase ; i, UDP-glucose pyrophosphorylase ; j, ADP-glucose pyrophosphorylase ; k, starch synthase ; l, starch-branching enzyme ; m, α -amylase ; n, β -amylase ; o, α -glucosidase ; p, starch phosphorylase. (d'après Foyer et Paul, 2001).

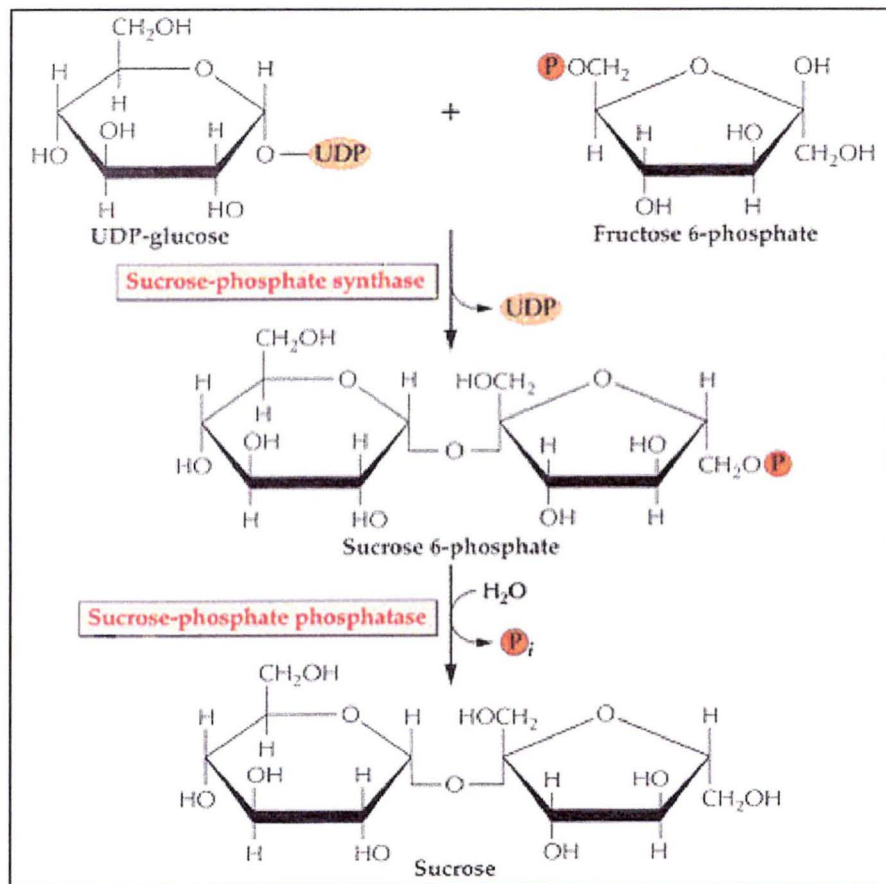


Figure 3 : Synthèse du sucrose par la sucrose phosphate synthase et la sucrose phosphate phosphatase (d'après Buchanan *et al.*, 2000).

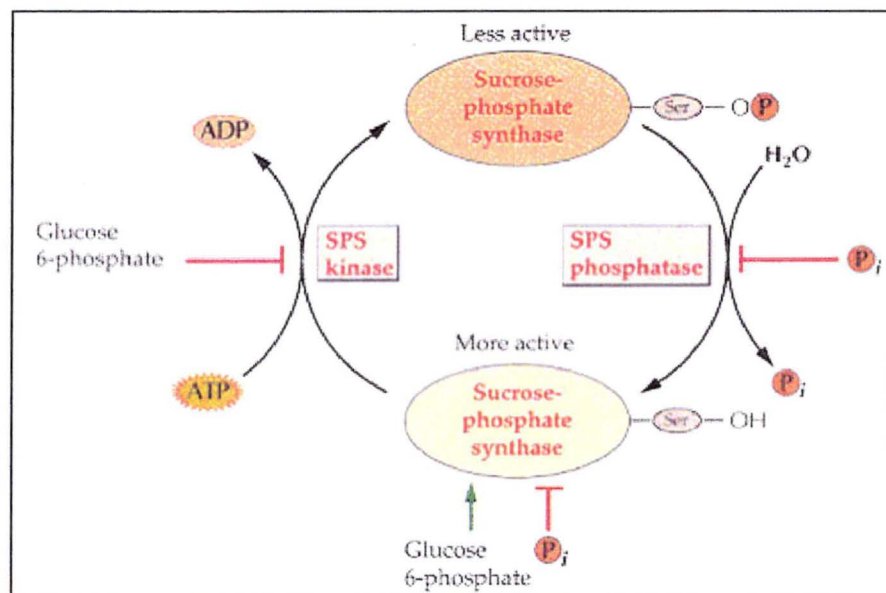


Figure 4 : Régulation de la sucrose phosphate synthase (SPS). SPS est régulée à la fois par des régulateurs allostériques et par la phosphorylation/déphosphorylation d'un résidu sérine de l'enzyme : le phosphate inorganique inhibe directement la forme la plus active de la SPS ainsi que la déphosphorylation de la SPS en agissant au niveau de la SPS phosphatase, le glucose 6-phosphate agit, lui, dans le sens de l'activation et du maintien de la forme la plus active de la SPS (d'après Buchanan *et al.*, 2000).

I. INTRODUCTION

I.1 LE SACCHAROSE DANS LA PLANTE

Dans la plupart des plantes supérieures, le saccharose est le disaccharide principalement produit dans les feuilles pendant la photosynthèse. Ce sucre est composé d'un glucose et d'un fructose liés par un lien glycosidique (Sturm et Tang, 1999). Pendant la période de luminosité, le dioxyde de carbone est fixé dans les organes verts, appelés organes sources (Figure 1, point 1). Il est alors soit stocké temporairement sous forme d'amidon, soit transporté sous forme de sucre soluble, le saccharose, via le phloème vers les organes hétérotrophes (Figure 1, point 2) où il est utilisé pour le maintien du métabolisme, la synthèse de la paroi cellulaire, le stockage ou comme substrat pour la respiration (Kutschera et Heiderich, 2002) (Figure 1, point 3, Figure 2). Le taux d'importation du saccharose est régulé par le gradient de concentration de sucre entre les feuilles, organes sources et les fruits ou les racines, organes consommateurs (Wang *et al* 1994).

I.1.1 Synthèse du saccharose.

La synthèse du saccharose est essentiellement catalysée par la saccharose phosphate synthase et la saccharose phosphate phosphatase (Sebkova *et al.*, 1995). Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et semblent former une unité métabolique durant la synthèse (Etxeberria, 2004).

La saccharose phosphate synthase (SPS) est une enzyme homotétramérique de 380 à 540 kDa qui catalyse une réaction essentielle et régulée dans le processus de synthèse du saccharose :

$\text{UDP-glucose} + \text{Fructose-6-phosphate} \rightarrow \text{UDP} + \text{Saccharose-6-phosphate}$ (Chen *et al.*, 2001).

Le saccharose-6-phosphate produit par la SPS est ensuite converti en saccharose par une autre enzyme : la saccharose phosphate phosphatase (Carlson et Chourey, 2002) (Figure 3). Différents nucléotides comme l'ADP, l'ATP ou encore l'UDP peuvent inhiber 30 à 50 % de l'activité SPS en agissant comme des inhibiteurs compétitifs se liant au site de liaison de l'UDP-glucose sur l'enzyme (Chen *et al.* 2001).

Dans les feuilles, la SPS est régulée par au moins deux mécanismes (Figure 4). Le premier est une régulation allostérique : l'enzyme est activée par la liaison de métabolites comme le glucose-6-phosphate et est inhibée par le P_i . Le second mécanisme consiste en une phosphorylation de la protéine (Chen *et al.* 2001). Dans les tissus consommateurs, SPS peut jouer différents rôles physiologiques importants tels que la biosynthèse et l'exportation du saccharose vers les graines en germination et les tubercules en croissance, l'accumulation du saccharose et sa dégradation dans les tissus cibles (Chen *et al.* 2001).

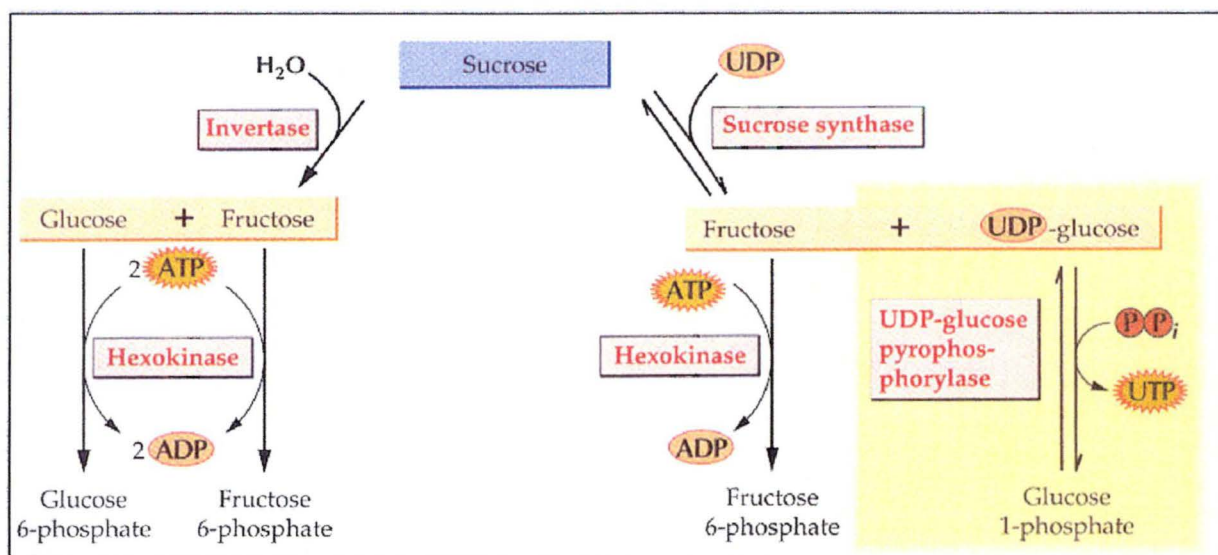


Figure 5 : Dégradation du sucrose. Les hexokinases utilisent l'ATP pour phosphoryler le glucose et le fructose produits par l'invertase. La sucrose synthase et l'UDP-glucose pyrophosphorylase agissent ensemble pour générer les hexoses phosphates par un processus dépendant de l'ATP (d'après Buchanan et al., 2000).

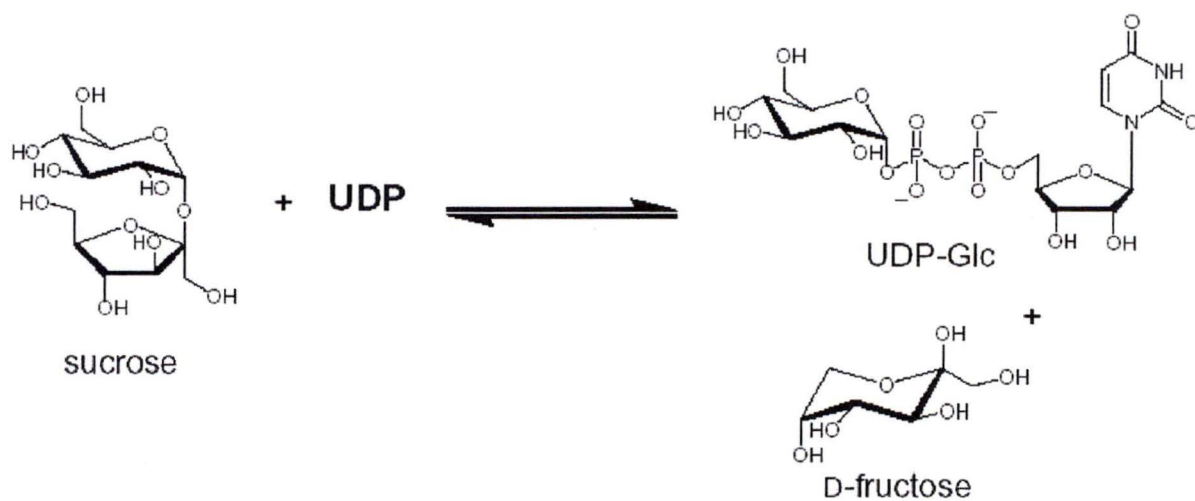


Figure 6 : Réaction de clivage et de synthèse du sucrose par la sucrose synthase (d'après Römer et al. 2004).

I.1.2 Dégradation du saccharose

Les plantes possèdent deux alternatives biochimiques pour la dégradation du saccharose (Figure 5) : la première implique l'hydrolyse par une invertase suivie par la phosphorylation via des hexo- et fructokinases, en utilisant l'ATP ou l'UTP comme donneurs d'énergie. Des isoformes d'invertases s'accumulent dans le cytoplasme (Invertases neutres ou alcalines), dans la vacuole (Invertases vacuolaires) et dans l'espace extracellulaire (Invertases de la paroi) (Sturm et Tang, 1999).

La seconde implique un clivage du saccharose dépendant de l'UDP, ce clivage étant catalysé par la sucrose synthase (SuSy), une glycosyl transférase (Sturm et Tang, 1999) selon la réaction suivante : **Saccharose + UDP \leftrightarrow UDP-glucose + fructose** (Bologa *et al.*, 2003) (Figure 6). L'UDP-glucose formé par SuSy est converti en Glucose-1-P et en UTP via une réaction dépendante de pyrophosphate inorganique (PPi) et catalysée par l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase). L'énergie conservée dans l'UTP peut être recyclée et utilisée pour la phosphorylation du fructose via une fructokinase.

Ces deux processus de dégradation du saccharose en hexose-phosphates diffèrent par leur coût énergétique : alors que la dégradation d'une molécule de saccharose via l'invertase nécessite deux molécules d'ATP, sa transformation via la SuSy et l'UGPase ne requiert qu'une seule molécule de PPi (Bologa *et al.*, 2003).

Bien que l'activité de la sucrose synthase soit principalement orientée vers la dégradation du saccharose son action réversible fait que cette enzyme peut aussi permettre, dans certains cas minoritaires, l'accumulation de saccharose. Ainsi dans la pêche en maturation, l'augmentation de l'activité de SuSy contribue à l'accumulation de saccharose, alors que chez le melon, la banane ou la mangue, le saccharose est synthétisé par la saccharose phosphate synthase plutôt que par SuSy (Tanase et Yamaki, 2000). En fait, la direction de la réaction catalysée par la sucrose synthase dépend essentiellement de l'équilibre UDP/UDP-glucose *in vivo* (Tanase et Yamaki, 2000).

Au cours du développement des tubercules de pommes de terre ainsi que dans les grains de maïs, l'invertase est exprimée avant la sucrose synthase (Bologa *et al.*, 2003). Des expériences de sur-expression de l'invertase pour limiter la dégradation du saccharose par la voie la moins coûteuse du point de vue de l'énergie, c'est-à-dire via la sucrose synthase, ont mené à une diminution importante du niveau d'ATP ainsi qu'à une inhibition de la synthèse d'amidon. Ces phénomènes sont dus à une augmentation de la consommation d'oxygène et aux performances moins efficaces qui en résultent. Ces résultats démontrent donc des rôles importants de la voie de dégradation du saccharose par SuSy dans les plantes, à savoir, limiter la perte d'oxygène dans la cellule et dès lors maintenir le métabolisme cellulaire en condition de carence en oxygène (Bologa *et al.*, 2003). Nous reviendrons ultérieurement sur ce point (cfr paragraphe 6).

1.2 CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DE LA SUCROSE SYNTHASE

La sucrose synthase est un homotétramère de masse moléculaire allant de 280 à 400 kDa, chaque unité de base ayant un poids moléculaire d'environ 70 à 90 kDa.

La réaction de clivage du saccharose présente un optimum dans une gamme de pH comprise entre 7,2 et 7,8, la plus haute activité étant mesurée à un pH neutre (Sebkova *et al.*, 1995).

Dans la direction de la synthèse du saccharose, la plus grande activité de SuSy est mesurée à une valeur de pH de 8,0. La sucrose synthase est la plus active à une température de 56°C, cependant sa stabilité à cette température est très faible. L'enzyme peut être inhibée, tant dans sa réaction de clivage que dans sa réaction de synthèse, par des cations divalents tels que Cu^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+} .

Une des caractéristiques des différentes isoformes de SuSy est la présence d'un résidu sérine conservé au niveau de l'extrémité N-terminale (cfr point 7). L'expression d'une SuSy dans *E.coli* fournit une enzyme dé-phosphorylée au niveau de ce résidu sérine, ce qui a pour conséquence une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le saccharose, et donc un moindre fonctionnement de cette enzyme dans le sens du clivage du saccharose tandis que les propriétés cinétiques des substrats utilisés dans la réaction de synthèse restent inchangées (Römer *et al.*, 2004).

Par contre, la phosphorylation *in vitro* d'une sucrose synthase recombinante augmente son affinité pour le saccharose d'un K_m de 161mM à un K_m de 61mM (Nakai *et al.*, 1998).

1.3 LOCALISATION DE L'ACTIVITE SUCROSE SYNTHASE

Une forte activité de la sucrose synthase est observée au niveau des organes hétérotrophes tels que les racines, les fruits et les jeunes feuilles, organes qui requièrent l'importation de saccharose et sa dégradation par la sucrose synthase pour leur développement. On considère dès lors que les patterns d'activité de la sucrose synthase fournissent une évaluation de la demande en carbone dans les tissus non photosynthétisants et peuvent être utilisés comme indicateurs de leur degré d'activité métabolique (Kraemer *et al.* 1998).

La SuSy a également été localisée au niveau des cellules compagnes des vaisseaux du phloème qui approvisionnent les organes consommateurs en saccharose.

1.3.1 Dans les organes consommateurs :

L'activité de la sucrose synthase est élevée dans les tissus racinaires en croissance active, caractérisés par une synthèse rapide de paroi cellulaire et une elongation au niveau de la pointe, ce qui fait de cette zone un endroit de grande demande en énergie et en squelettes carbonés (Kraemer *et al.* 1998).

Dans les méristèmes à la base des jeunes feuilles de maïs, SuSy est très abondante et peut atteindre jusqu'à 3 à 8 % des protéines totales. Quand les cellules s'éloignent du méristème et commencent la transition vers l'autotrophie, une diminution importante de la quantité de SuSy est observée (Hardin *et al.*, 2003).

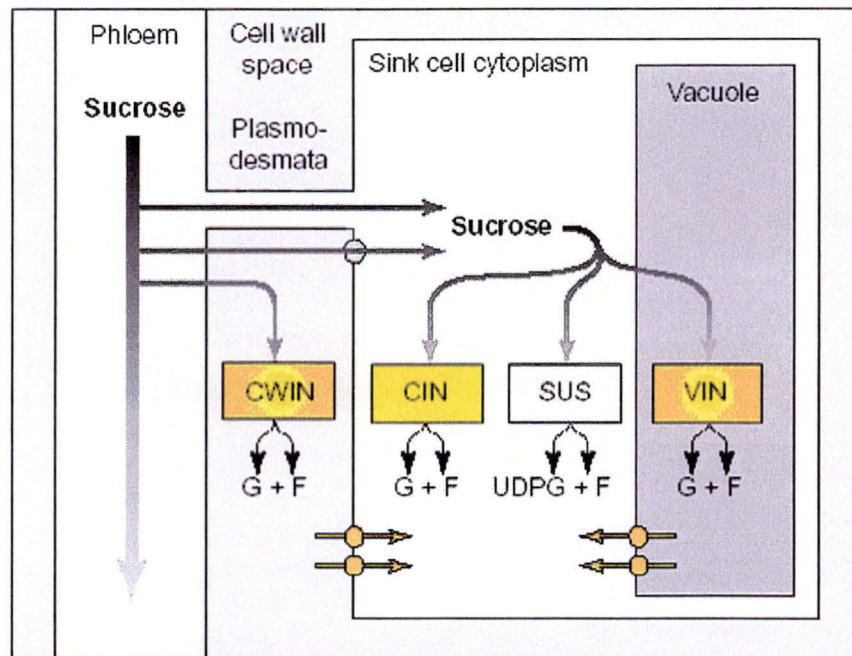


Figure 7 : Le déchargement du phloème peut se faire par les voies symplasmiques et apoplasmiques. En fonction de la voie par laquelle le sucrose entre dans les cellules (via les plasmodesmes ou via la paroi cellulaire), le sucrose peut être clivé par des invertases de la paroi (CWIN), des invertases cytoplasmiques (CIN), des sucrose synthases (SUS) ou, sachant que le sucrose cytoplasmique peut être transporté dans la vacuole pour y être clivé, par des invertases vacuolaires (VIN) (d'après Koch *et al.* 2004).

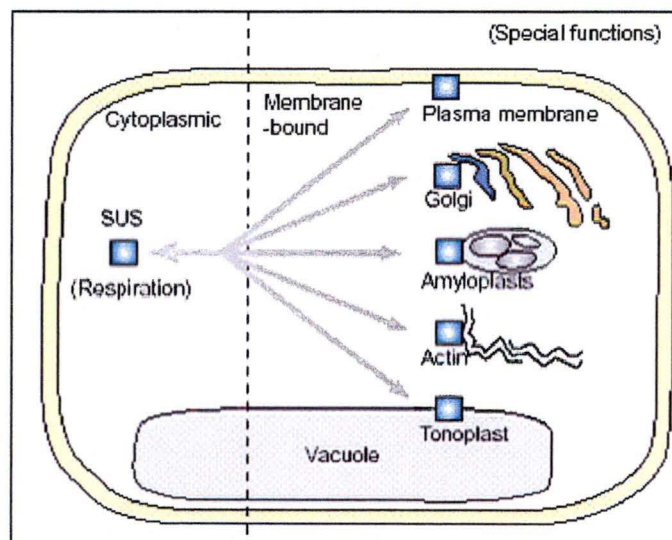


Figure 8 : Présentation des différentes localisations subcellulaires de la sucrose synthase. Cette enzyme a été mise en évidence en association avec la membrane plasmique, les filaments d'actine et l'appareil de Golgi, ainsi qu'au niveau des amyloplastes ou encore au niveau des tonoplastes (d'après Koch, 2004).

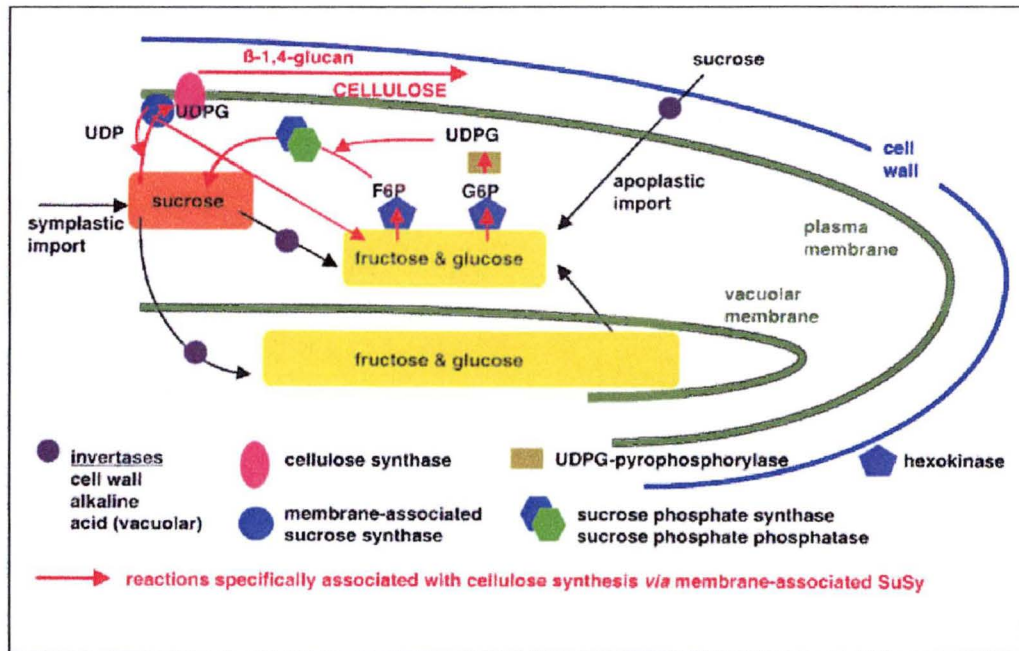
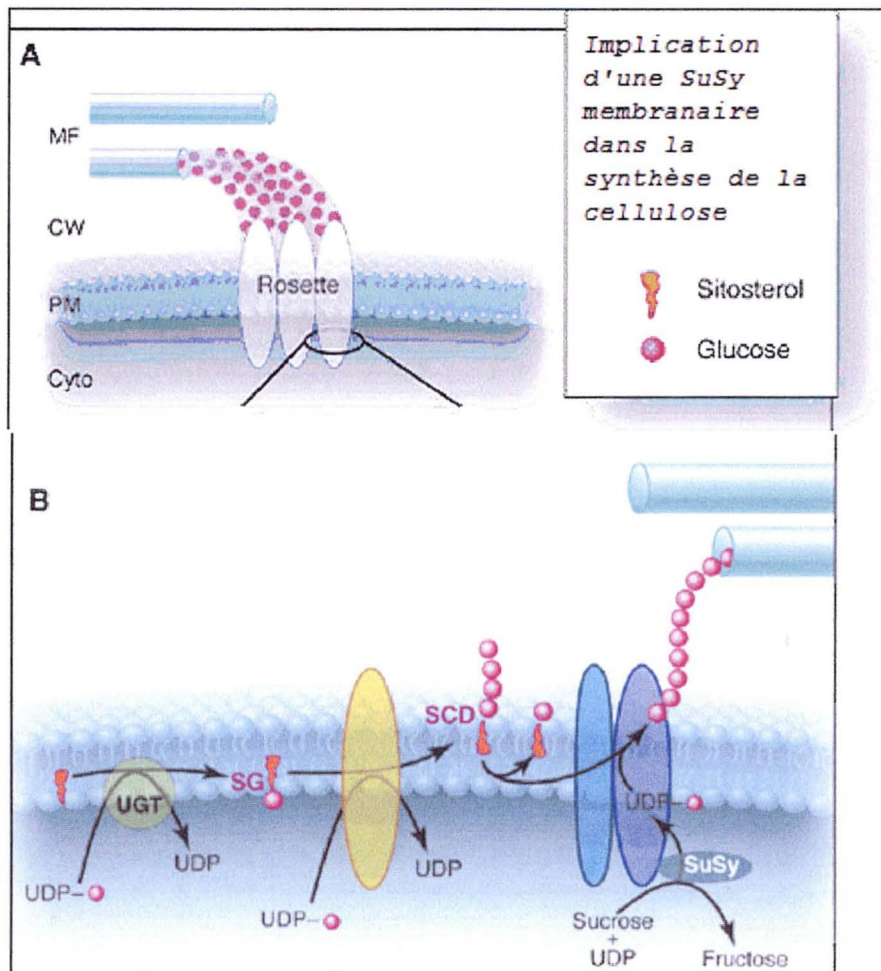


Figure 9 : Modèle général de la synthèse de cellulose dans les fibres de coton faisant intervenir la sucrose synthase pour la fourniture d'UDP-glucose à la cellulose synthase. Les flèches rouges indiquent les réactions associées à la synthèse de cellulose par l'intermédiaire d'une SuSy membranaire (d'après Haigler et al., 2001).



(d'après Read et Bacic, 2002)

Figure 10 : Implication d'une SuSy membranaire dans la synthèse de cellulose (détail). Les celluloses synthases en rosette dans la membrane plasmique de la cellule végétale. A. Vue longitudinale de la rosette composée de 6 particules élémentaires pendant l'élongation de la microfibrille de cellulose (MF). La sucrose synthase (SuSy) sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique (PM) apportera l'UDP-glucose aux 36 chaînes glucaniques en croissance qui sont ensuite extrudées dans la paroi cellulaire où elles s'assemblent pour former les microfibrilles. B. Initiation de la synthèse de cellulose. L'UDP-glucosyl transférase (UGT) transfère un résidu glucose d'une molécule d'UDP-glucose sur une molécule de sitostérol à la face cytoplasmique de la membrane plasmique, ce qui forme un sitostérol-glucoside (SG). La petite chaîne de glucose est allongée avec des résidus glucose provenant de molécules d'UDP-glucose pour former une chaîne sitostérol-cellodextrine (SCD). La chaîne de cellodextrine passe sur la face externe de la membrane plasmique où elle est clivée par une cellulase avant d'être allongée par addition d'UDP-glucose fourni par la sucrose synthase.

1.3.2 Au niveau du phloème :

En utilisant la technique du gène rapporteur, Wang et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence de sucrose synthase au niveau du phloème des feuilles et des racines d'*Arabidopsis*, et plus particulièrement au niveau des cellules compagnes du phloème. Différentes hypothèses ont été émises quant à l'importance physiologique de SuSy dans les cellules compagnes : elle serait impliquée dans le catabolisme du saccharose pour générer l'ATP nécessaire pour le chargement du phloème (Sturm et Tang, 1999). En effet, dans beaucoup de plantes, le chargement du saccharose dans le phloème par un co-transport saccharose/proton se fait contre un gradient de concentration et est alimenté en énergie par une H^+ -ATPase membranaire. La SuSy interviendrait pour dégrader le saccharose et fournir ainsi l'ATP nécessaire à l' H^+ -ATPase pour établir le gradient en protons (Martin *et al.*, 1993). D'autre part, elle assurerait le maintien d'un équilibre entre le saccharose phloémien et les produits de dégradation pour empêcher les pertes de saccharose pendant le transport ainsi que la production de glucose pour la respiration des cellules compagnes et la fourniture de précurseurs pour la synthèse de complexes carbonés comme la callose (Wang *et al.*, 1994).

Le déchargement du phloème peut quant à lui s'opérer par les voies apoplasmiques (au travers de la paroi) et symplasmiques (via les plasmodesmes). La voie symplasmique fait surtout intervenir la sucrose synthase car l'activité des invertases cytoplasmiques est généralement faible alors que la voie apoplasmique fait surtout intervenir les invertases. La voie de déchargement symplasmique est prépondérante dans la plupart des tissus consommateurs comme les racines, les tiges et les fruits (Koch, 2004) (Figure 7).

1.4 ROLES DE SUSY

En plus de son rôle important dans le chargement et le déchargement du saccharose au niveau du phloème (cfr précédemment), la sucrose synthase joue un rôle clé dans (a) la synthèse d'hexose phosphate par une voie économisant l'ATP (cfr paragraphe 1), (b) la synthèse des polysaccharides pariétaux dont la cellulose et la callose (c) la conversion du saccharose en amidon, (d) la fixation de l'azote dans les nodules des espèces légumineuses, (e) la mobilisation du saccharose au niveau des tonoplastes et (f) les changements liés au froid et à l'anaérobiose (cfr paragraphe 6). Cette plasticité fonctionnelle est probablement due à la capacité de l'enzyme à utiliser plusieurs nucléosides, à sa réversibilité catalytique et à sa compartimentation cellulaire (Etxeberria et Gonzalez, 2003). En effet, SuSy est non seulement présente dans le cytoplasme des cellules des organes hétérotrophes mais elle est également associée avec la membrane plasmique ou encore avec le tonoplaste de ces mêmes cellules (Figure 8).

1.4.1 Rôle de la SuSy dans la synthèse des polysaccharides pariétaux.

Dans le cytoplasme et au niveau du Golgi, la sucrose synthase fournit l'UDP-glucose, précurseur diphosphonucléosidique de base pour la synthèse des polysaccharides de la matrice pariétale : la pectine et les hémicelluloses. La SuSy, qu'elle soit sous forme soluble ou associée à la membrane plasmique, fournit l'UDP-glucose indispensable à la synthèse de cellulose et de callose médiée par des complexes cellulose synthase (Figures 9-10) et callose synthase de la membrane.

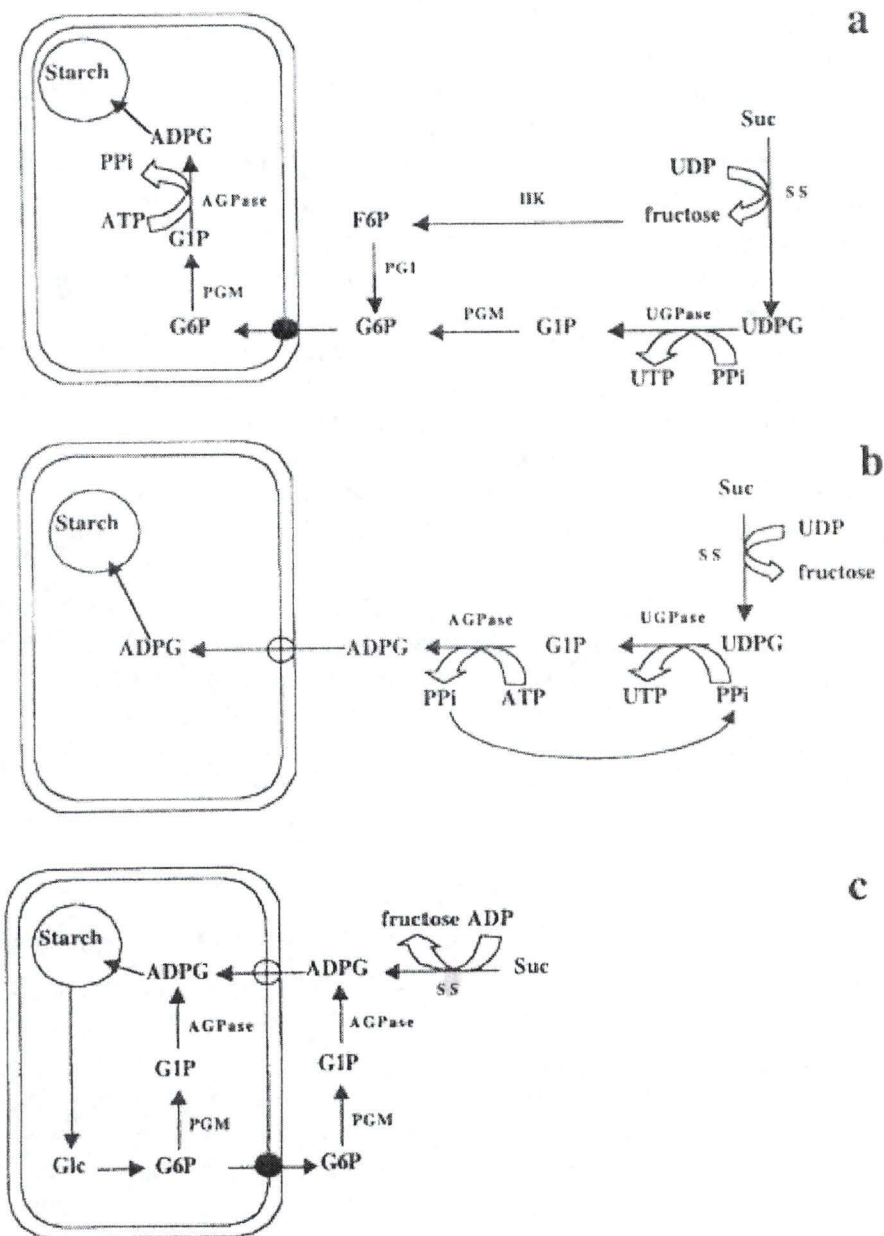


Figure 11 : Modèles de la conversion du sucrose en amidon dans les organes hétérotrophes.

(a) chez les dicotylédones, la sucrose synthase convertit le sucrose en fructose et UDP-glucose, lesquels sont ensuite utilisés pour la synthèse du pool d'hexoses phosphates qui sont ensuite transportés dans l'amyloplaste. L'AGPase utilise alors cette réserve d'hexoses pour former l'ADP-glucose (ADPG) nécessaire à la synthèse de l'amidon dans l'amyloplaste. (b) Chez les monocotylédones, l'ADPG est synthétisé par les mêmes enzymes dans le cytoplasme, avant d'être transloqué dans l'amyloplaste (c) Chez les monocotylédones comme chez les dicotylédones, l'ADPG, est synthétisé soit dans le cytoplasme par la SuSy et l'AGPase avant d'être transporté dans l'amyloplaste, soit dans l'amyloplaste lui-même, par l'action de l'AGPase, en utilisant des molécules de glucose produites par la dégradation de l'amidon dans le plaste. (d'après Baroja-Fernández *et al.*, 2003).

Coupler des SuSy à des glucanes synthases présente le triple avantage de (a) permettre la synthèse de cellulose, le composé organique le plus abondant dans le monde (Kutschera et Heiderich, 2002), sans utilisation d'énergie supplémentaire, autre que celle contenue dans le lien glycosidique du saccharose, (b) permettre également la synthèse de callose, marqueur de mort cellulaire causé par des stress biotiques et abiotiques dans les plantes, de manière à faciliter par exemple la mort de tissus racinaires submergés et par là même limiter l'utilisation de carbone dans des conditions de stress (Subbaiah *et al.*, 2001), ainsi que (c) le recyclage de l'UDP, un composé qui inhibe les réactions catalysées par la cellulose synthase et la callose synthase (Albrecht et Mustroph, 2003) et (d) d'éviter la compétition pour l'utilisation de l'UDP-glucose par d'autres voies (Haigler *et al.*, 2001). Il semble que la cellulose synthase utilise directement l'UDP-glucose de la SuSy qui lui est associée, tandis que la callose synthase accepterait l'UDP-glucose des SuSy cytoplasmiques et des SuSy associées aux membranes.

1.4.2 Rôle de la SuSy dans la synthèse d'amidon.

Le processus de clivage du saccharose par la sucrose synthase est habituellement associé à la synthèse d'amidon dans les tissus non-photosynthétisants tels des tubercules et des graines en développement (notamment chez le maïs et le pois) (Liao et Wang, 2003). En effet, il est généralement admis que la SuSy convertit le saccharose en UDP-glucose (UDPG) qui est ensuite transformé, après différentes étapes, en glucose 1-phosphate (G1P) lui-même converti par l'AGPase en ADP-glucose (ADPG), nécessaire pour la synthèse de l'amidon (Figure 11a et b). Des études ont montré qu'une réduction de l'activité de l'ADPG pyrophosphorylase (AGPase) dans les amyloplastes n'affectait pas l'accumulation de l'amidon (Baroja- Fernández E. *et al.*, 2003). En conséquence, il semble plus probable que la majorité de l'ADPG soit synthétisé dans le cytoplasme et ensuite transportés dans l'amyloplaste. L'AGPase étant essentiellement localisée dans les amyloplastes, il a été formulé l'hypothèse de l'existence dans le cytoplasme d'une autre enzyme impliquée dans la synthèse de l'ADPG. Bien que l'UDP soit généralement considéré comme le nucléoside diphosphate de choix exploité par la SuSy, la capacité de l'enzyme à utiliser l'ADP pour produire de l'ADPG a également été démontrée (Baroja- Fernández E. *et al.*, 2003). C'est sur cette base qu'un modèle alternatif de la conversion du saccharose en amidon a été proposé (Figure 11c). Selon ce modèle, l'ADPG peut être synthétisé par deux mécanismes différents : par la sucrose synthase, en utilisant le saccharose fraîchement importé ou par l'interaction de la phosphoglucomutase (PGM) et de l'AGPase, en recyclant les molécules de glucose produites par la dégradation de l'amidon dans les amyloplastes (Baroja- Fernández E. *et al.*, 2003).

Par contre, dans ces mêmes tissus non-photosynthétisants, l'hydrolyse du saccharose par les invertases et les hexoses qui en résultent semblent servir de signal de division cellulaire pendant les premiers stades de développement

1.4.3 Rôle de la SuSy dans la nodulation chez les légumineuse.

L'expression de SuSy est aussi associée à des processus importants comme le développement des nodules dans les plantes de type légumineuses. En effet, le fonctionnement des nodules de légumineuses dépend largement de l'importation et du métabolisme du saccharose pour fournir l'énergie et les squelettes carbonés indispensables à la fixation biologique de l'azote, à l'assimilation de l'ammoniaque ainsi qu'à l'exportation des

acides aminés résultant de la fixation. De plus, les tissus nodulaires en croissance rapide nécessitent un apport de saccharose pour la synthèse de cellulose (Röhrig *et al.*, 2002). Ainsi, une mutation *rug4-a* qui réduit les taux de sucrose synthase dans les nodules de pois inhibe la fixation de l'azote par ces derniers (Gordon *et al.*, 1999). D'autre part, si des nodules de soja présentent des symbiotes incapables de fixer l'azote, la SuSy n'est pas induite (Koch, 2004).

1.4.4 Rôle de la SuSy au niveau des tonoplastes.

La SuSy est également localisée au niveau des tonoplastes (membranes périvacuolaires) où elle jouerait un rôle dans la mobilisation du saccharose vacuolaire. La quantité totale de SuSy liée aux tonoplastes serait de 7% environ de l'activité totale de SuSy dans le tissu (Etxeberria et Gonzalez, 2003). Des études sur la mobilisation du saccharose de la vacuole dans les cellules du scutellum¹ de maïs suggèrent l'association de SuSy avec le tonoplaste (Etxeberria et Gonzalez 2003), l'activité totale des invertases étant insuffisante pour justifier les taux d'utilisation de saccharose qui ont été mesurés dans ces cellules alors que la quantité de saccharose cytosolique restait intacte. Le fait que le saccharose vacuolaire est catabolisé, tandis que le saccharose cytosolique reste intact, indique non seulement l'existence d'une SuSy associée avec le tonoplaste mais également la participation de cette dernière dans le transport de saccharose (Etxeberria et Gonzalez, 2003).

Des réactions d'immunoprécipitation sur des tonoplastes purifiés à partir d'endosperme de maïs ainsi que sur des hypocotyles de betterave montrent qu'environ 7,2% la quantité totale de SuSy restent attachés au tonoplaste (Etxeberria et Gonzalez 2003). L'enzyme semble être liée à un composant de la membrane à la surface de la bicouche lipidique et ne serait pas une protéine transmembranaire (Etxeberria et Gonzalez 2003).

La mobilisation du saccharose de la vacuole est indispensable pour le maintien de nombreux processus métaboliques, spécialement durant la dormance, le bourgeonnement, et l'activité photosynthétique. Le saccharose mobilisé est utilisé pour répondre à la demande intracellulaire accrue ou pour un transport à longue distance, par exemple vers des organes reproducteurs en développement. Le transport extra-cellulaire sur de longues distances implique un système de vésicules transportant le saccharose de la vacuole des cellules de stockage vers l'apoplasme (Echeverria, 2000). Par contre, pour supporter les demandes pour le métabolisme interne, Etxeberria et Gonzalez (2003) décrivent un système de transport dans lequel les SuSy associées au tonoplaste participent au transport du saccharose de la vacuole vers le cytosol. Dans ce modèle, le saccharose est exporté de la vacuole par des transporteurs de saccharose dépendants de l'ATP et amené aux SuSy qui sont fixées à la partie cytoplasmique du tonoplaste. En présence d'UDP, SuSy catalyse la dégradation de ce saccharose et libère l'UDP-glucose et le fructose dans le cytosol. Il semble improbable que tout le saccharose mobilisé à partir de la vacuole soit catalysé par la SuSy étant donné que le saccharose a d'autres fonctions physiologiques et peut être utile dans le cytoplasme sous forme de disaccharide.

Ces rôles très divers que nous venons de décrire peuvent être mis en parallèle avec l'existence de nombreuses isoformes de sucrose synthase chez les végétaux étudiés. Nous allons aborder ce point plus en détail dans le paragraphe suivant.

¹ Scutellum : large cotylédon d'un embryon de graminées.

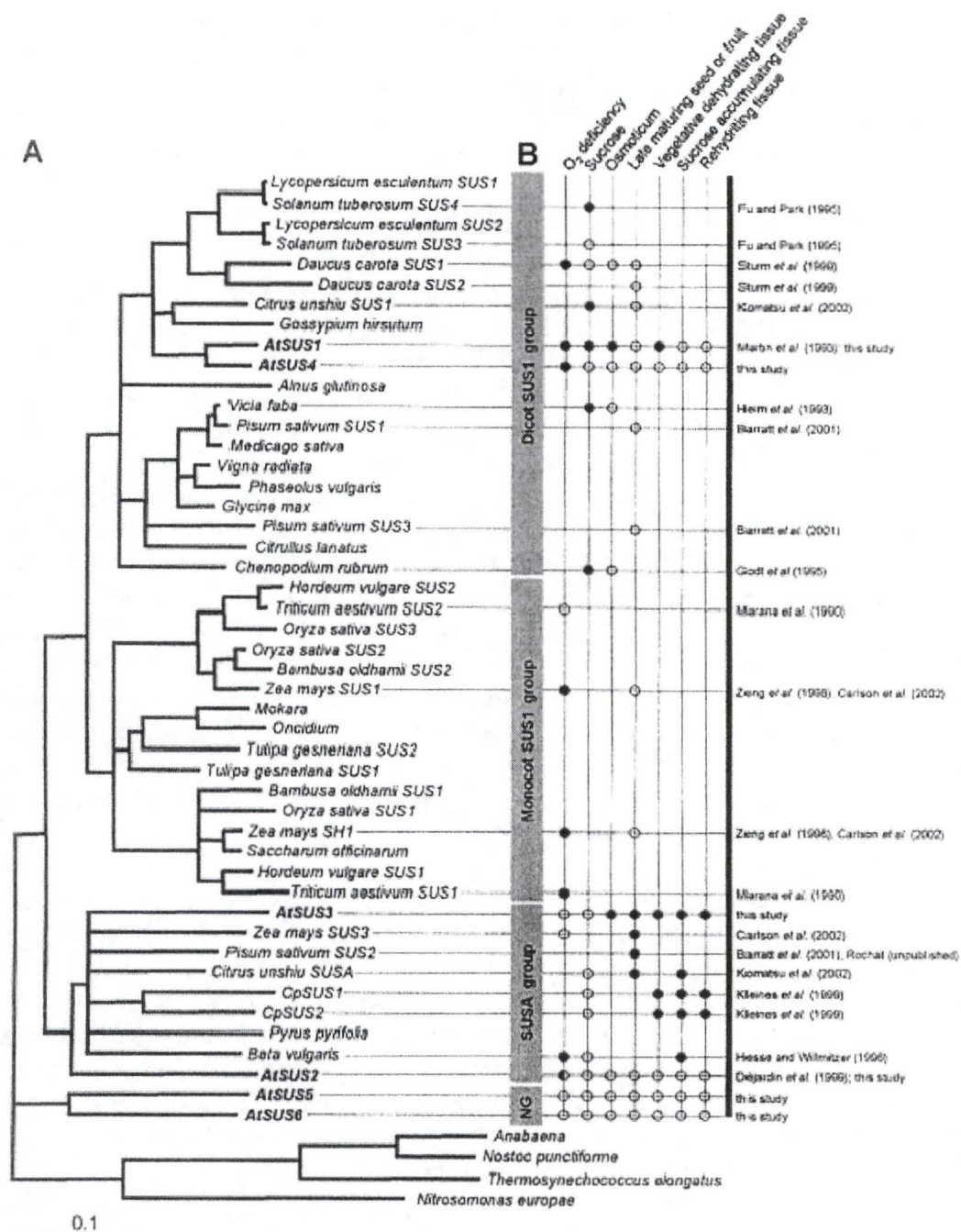


Figure 12 : Tableau de comparaison des séquences en acides aminés et des schémas d'expression d'isoformes de sucrose synthases. Trois grands groupes ont été définis : le groupe SUS1 des dicotylédones, le groupe SUS1 des monocotylédones et le groupe SUS4. Les isoformes AtSUS5 et AtSUS6 forment un nouveau groupe (d'après Baud *et al.*, 2004).

1.5 ISOFORMES DE LA SUCROSE SYNTHASE

La plupart des gènes de sucrose synthase caractérisés jusqu'à présent appartiennent à de petites familles multigéniques, chez les espèces monocotylédones comme chez les dicotylédones (Baud *et al.*, 2004) et subissent une régulation spatiale et temporelle ; en effet, ces isoformes ont des expressions et des régulations différentes selon leur localisation et en réponse à des traitements au froid, à l'anoxie et à des concentrations élevées en saccharose et peuvent être impliquées dans des voies métaboliques distinctes (Run *et al.* 2003).

La comparaison des séquences en acides aminés des sucrose synthases a permis de les classer en trois principaux groupes : le groupe *SUS1* chez les monocotylédones et deux groupes, *SUS1* et *SUSA* chez les dicotylédones (Baud *et al.*, 2004) (Figure 12).

Deux gènes de SuSy ont été décrits chez la carotte, la tomate, la pomme de terre, la betterave, l'orge, le froment et la canne à sucre. Cependant, chez le riz, la poire, le citron (Komatsu *et al.* 2002) de même que chez le maïs, un troisième gène (*Sus3*) est présent (Carlson et Chourey, 2002). Les produits de ces gènes chez la poire et le riz sont des protéines de 808 acides aminés pour SuSy1 et 816 acides aminés pour SuSy 2 et 3. Les isoenzymes SuSy 1 et 2 de différentes espèces de plantes supérieures partagent une homologie de 80 à 95% (Romer *et al.*, 2004). Chez le maïs, les isoformes désignées *Sus1* et *Sus3* sont présentes dans de nombreux tissus tandis que la troisième isoforme, *Sh1*, est surtout exprimée au niveau de l'endosperme (Hardin *et al.*, 2003). Chez la poire, l'isoforme *SSI* a la même affinité pour l'UDP-glucose et l'UDP. Son activité est majoritairement localisée dans le fruit jeune qui accumule beaucoup d'amidon et de composants pariétaux, mais peu de saccharose.

Cette isoforme de SuSy interviendrait donc surtout pour fournir les substrats pour la synthèse de ces composés, par clivage du saccharose, plutôt que pour la synthèse de ce dernier. Par contre l'isoforme *SSII*, prédominante dans le fruit mature, a une plus grande affinité pour l'UDP-glucose que pour l'UDP, ce qui indiquerait que cette isoforme de SuSy agirait principalement dans le sens de la synthèse de saccharose (Tanase et Yamaki, 2000).

Le séquençage complet du modèle végétal, *Arabidopsis thaliana*, a permis de décrire la plus grande famille de sucrose synthase connue jusqu'à présent. Celle-ci comprend six membres qui partagent deux domaines caractéristiques : le domaine sucrose synthase et le domaine glucosyl-transférase.

Ces isoformes ont été classées dans trois groupes distincts sur base des homologies entre les séquences : *AtSUS1* et *AtSUS4* présentent le plus grand pourcentage d'acides aminés identiques et sont classées dans le vaste groupe *SUS1* des dicotylédones, *AtSUS2* et *AtSUS3* paraissent étroitement liées et sont rangées dans le groupes *SUSA* des dicotylédones tandis que *AtSUS5* et *AtSUS6* sont assez différentes des quatre autres isoformes et constituent donc un groupe séparé (Baud *et al.*, 2004).

Ces six gènes *AtSUS* présentent des expression distinctes mais se chevauchant. *AtSUS1* est présent de façon assez constante dans tous les organes (sources et consommateurs) testés par Baud et ses collaborateurs, à savoir les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs et les siliques tandis que *AtSUS4* semble plus exprimée au niveau des racines, de la tige et des parois des siliques. Ces deux isoformes sont fortement induites par

l'anoxie² (cfr paragraphe 6), condition qui limite l'apport en ATP et favorise une demande importante en sucre (Martin *et al.*, 1993). L'expression d'AtSUS1 et d'AtSUS4 diffère cependant en réponse à la déshydratation, le niveau de transcrit d'AtSUS1 augmente de 8 fois suite à la déshydratation et de 24,5 fois suite à un traitement au froid alors que, dans les mêmes conditions, le niveau des transcrits d'AtSUS4 reste constant (Baud *et al.*, 2004). AtSUS 5 et AtSUS6 sont exprimées partout dans la plante et ne présentent aucune réponse particulière en cas de stress. AtSUS2 est à peine détectable dans les organes examinés, à l'exception des graines en germination, et n'est pas induite dans les feuilles en réponse à différents stress abiotiques tels qu'une déficience en oxygène et une déshydratation. AtSUS3 est exprimée dans la paroi des siliques, dans les graines en fin de maturation (le niveau de transcrits de AtSUS3 augmente tandis que le contenu en eau des parois diminue de manière constante) et dans les premières étapes de la germination des graines. AtSUS3 est présenté comme un marqueur de déshydratation.

Les différentes isoformes de la sucrose synthase réalisent des fonctions métaboliques distinctes dans les plantes mais il existe dans la littérature des contradictions quant à la détermination des rôles précis de ces différentes protéines : ainsi, sur base de la déficience en amidon des mutants Sh1 de maïs, qui ne produisent pas cette isoforme, il a été proposé que l'isoforme Sh1 était importante pour la biosynthèse d'amidon (Chourey et Nelson, 1976 ; Chourey, 1981). Plus tard, sur base de l'étude de doubles mutants *sh1-sus1*, Chourey et ses collaborateurs (1998) ont attribué un rôle dans la synthèse de cellulose et de callose pour l'isoforme Sh1, et un rôle dans la synthèse d'amidon pour l'isoforme Sus1.

Ajoutons que s'il est possible d'attribuer dans certains cas une fonction particulière à l'une ou l'autre isoforme de SuSy, la localisation subcellulaire d'une isoforme donnée n'est pas encore connue. Toutefois, il est maintenant clairement établi que cette localisation pourrait dépendre de l'état phosphorylé ou non de l'enzyme (cfr le point7).

1.6 SUSY EN CONDITION DE STRESS.

Des études basées sur la régulation de l'expression des gènes de SuSy permettent de classer les gènes de SuSy en deux catégories: une première qui comprend les gènes exprimés de manière constitutive comme *Sus1* dans le maïs ou *SS2* dans le froment, et une seconde qui regroupe les gènes dont l'expression est fortement régulée par des facteurs endogènes (tels que des variations de concentration en sucres) ou environnementaux (tels que privation d'oxygène et faibles températures) comme *Sh1* dans le maïs (Martin *et al.*, 1993).

Ainsi, deux des trois gènes de sucrose synthase dans le maïs, *Sh1* et *Sus1*, présentent des réponses contraires face aux changements du taux de sucres dans les tissus. En effet, l'ARN messager de *Sh1* est exprimé au maximum en conditions de limitation en sucres (environ 0.2% de glucose), tandis que le niveau de transcrits de *Sus1* atteint son maximum pour une concentration en glucose dix fois supérieure (environ 2%) (Koch *et al.*, 1992).

D'autre part, une augmentation de l'activité sucrose synthase a été observée dans des plants de blé exposés à de faibles températures (2-4°C) présentant une accumulation de saccharose une heure déjà après le début du stress au froid. Crespi et son équipe (1991) ont

² Anoxie : Privation complète d'oxygène (0% en oxygène)

montré que la quantité de SuSy augmentait suite au stress, en conséquence d'une augmentation de la quantité d'ARNm. De plus, seul le niveau d'ARNm de l'isoforme SS1 du blé augmentait fortement alors que la quantité d'ARNm de l'isoforme SS2 était peu affecté par les faibles températures (Marana *et al.*, 1990).

Par ailleurs, de faibles concentrations en oxygène présentent un stress environnemental important et induisent des changements dans l'expression de certains gènes chez les végétaux. La plupart des gènes sont rapidement régulés négativement sous des conditions anaérobies mais il y a des exceptions : parmi les protéines induites par de faibles concentration en O₂, la sucrose synthase occupe une place prédominante puisqu'elle catalyse la première étape essentielle de l'utilisation du carbone par les cellules qui importent le saccharose. Bien que la SuSy et l'invertase clivent toutes deux le saccharose, la dégradation par l'invertase décline en condition d'anoxie. La SuSy joue donc le rôle principal dans l'utilisation du saccharose (Zeng *et al.* 1998). En condition de carence en oxygène, les cellules végétales, comme les cellules animales, peuvent continuer de synthétiser de l'ATP mais avec un rendement nettement plus faible que via la respiration cellulaire. Par ce processus, le glucose est transformé en acide pyruvique par glycolyse, ce qui fournit deux molécules d'ATP ; cet acide est ensuite converti en éthanol, par le processus de fermentation alcoolique, ce qui permet la régénération du NAD⁺ nécessaire à l'oxydation d'une nouvelle molécule de glucose par glycolyse. La sucrose synthase interviendrait pour fournir le carbone pour la glycolyse et la fermentation.

Ces conditions anaérobies agissent essentiellement au niveau transcriptionnel. Ainsi, dans les racines de maïs en hypoxie³, la synthèse d'ARNm de *Sus1* est rapidement induite tandis que l'anoxie interfère peu avec la transcription de *Sus1*. Par contre, la quantité d'ARNm de *Sh1* augmente fortement sous anoxie, alors que l'hypoxie a moins d'effet sur la transcription de ce gène. Cependant, la faible transcription de *Sh1* en condition d'hypoxie s'accompagne d'une forte augmentation d'activité enzymatique SuSy due à une production importante de protéines Sh1. Ce contraste indique que des régulations complémentaires au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel interviennent dans les conditions d'anoxie (Zeng *et al.* 1998).

De plus, les tubercules de pomme de terre sont plus sensibles aux pathogènes en condition de carence en oxygène. Le fait d'épargner l'ATP et l'oxygène par la voie de SuSy, fournit une stratégie importante de défense face à un taux limité en oxygène et pour empêcher l'anoxie. Ceci correspond aux observations selon lesquelles les gènes codant pour des invertases sont réprimés tandis que ceux codant pour des SuSy sont induits en réponse à de faibles concentrations en oxygène (Bologa *et al.*, 2003).

1.7 Phosphorylation de la sucrose synthase

La sucrose synthase peut être compartimentée dans la cellule, suite à son association avec les membranes ou avec les filaments d'actine. Comme il a été mentionné précédemment, la sucrose synthase peut être phosphorylée au niveau d'un résidu sérine, du côté de l'extrémité N-terminale de la protéine (Ser 15 pour SS1 dans le maïs, Ser 11 chez le peuplier et le soja).

En fait, les feuilles de maïs contiennent deux activités protéines kinases dépendantes du Ca⁺⁺ qui phosphorylent les sérines 15 et 170. La spécificité de la kinase pour la sérine 170

³ Hypoxie : diminution modérée de la quantité d'oxygène dans les tissus (3% en oxygène)

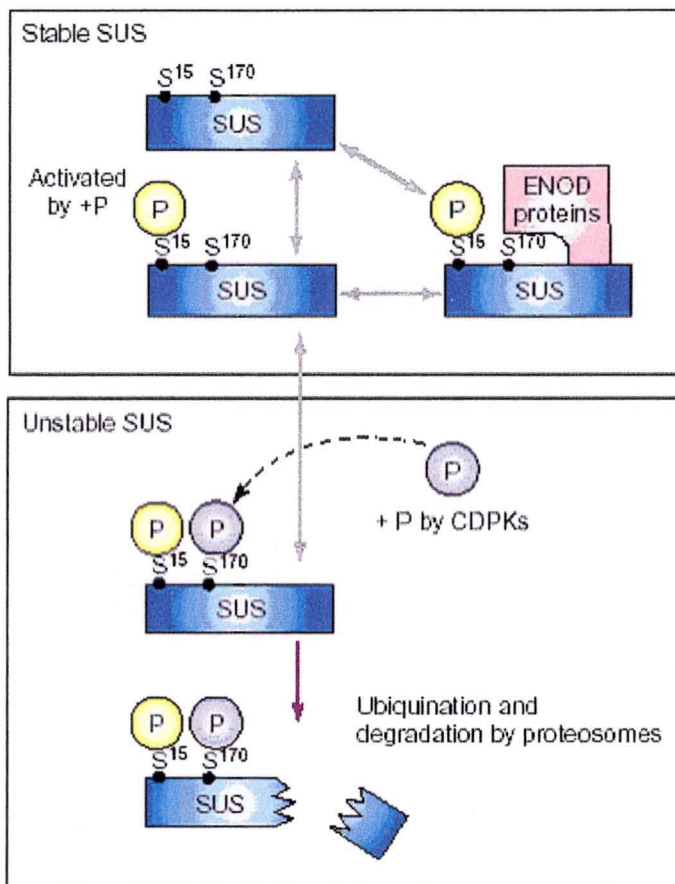


Figure 13 : Modèle résultant d'observations *in vitro* présentant le rôle de la phosphorylation de la Sérine 170 de la SuSy comme élément déclenchant de la dégradation de cette protéine par le protéasome. Ainsi, selon ce modèle, la SuSy est stabilisée par la fixation d'une protéine endogène au niveau de la sérine 170 qui empêche la phosphorylation de celle-ci. Par contre, si cette protéine est absente, la phosphorylation peut se faire, ce qui dirige la SuSy vers la dégradation par le protéasome (d'après Koch, 2004).

est trois fois plus faible que pour la sérine 15 et la phosphorylation de S170 est stimulée par une phosphorylation antérieure de la sérine 15 (Hardin *et al.* 2003). Des phosphorylations similaires de SuSy ont été montrées au niveau de l'extrémité N-terminale chez la tomate, chez le coton et chez le soja (Hardin *et al.* 2003).

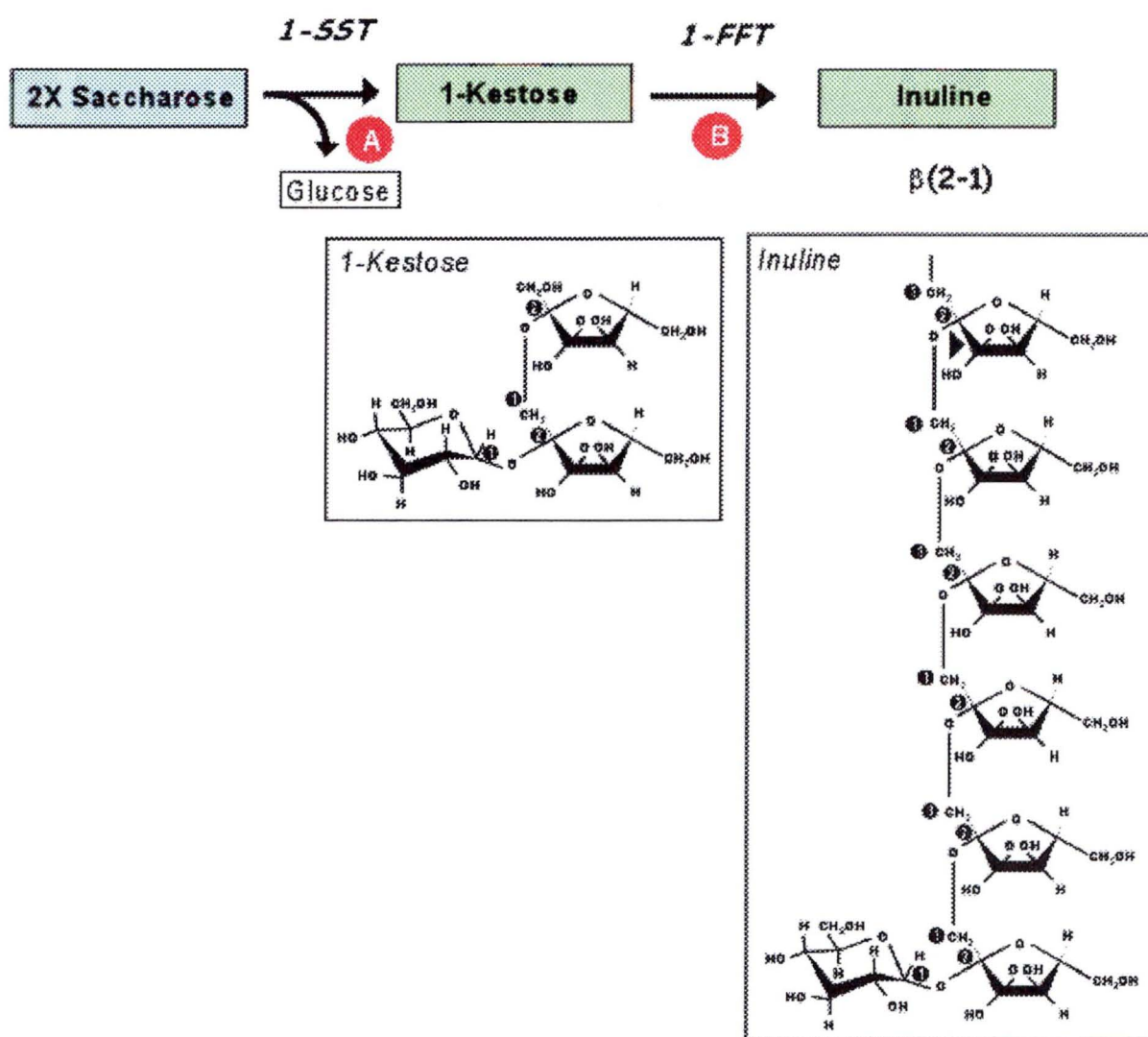
La phosphorylation de la SuSy au niveau de la sérine 15 non seulement stimule la réaction de dégradation du saccharose en augmentant l'affinité de l'enzyme pour le saccharose et l'UDP (Tanase et Yamaki, 2000) mais surtout agirait comme un élément clé dans la répartition de l'enzyme entre le cytosol et les membranes. Ces différentes formes de SuSy, aux différents emplacements dans la cellule auraient pour fonction d'apporter le carbone aux diverses voies métaboliques. Dans ce cas, le contrôle de la localisation de l'enzyme permettrait de déterminer comment une cellule en croissance utilise le saccharose (Subbaiah *et al.*, 2001).

Cependant, la signification de cette modification post-traductionnelle *in vivo* n'est pas très claire. Alors que chez le maïs la phosphorylation de la sérine 15 permettrait la solubilisation de la forme membranaire de la SuSy (Subbaiah *et al.*, 2001), chez le peuplier, la localisation de la SuSy dans les fractions solubles et membranaires n'est pas dépendante de l'état phosphorylé ou non de la sérine 11 (Konishi *et al.*, 2004). Il apparaît de plus en plus que l'étendue de la phosphorylation dans les différentes fractions varie en fonction des systèmes étudiés, de sorte que l'enzyme cytoplasmique soluble soit hypo-, hyperphosphorylée ou phosphorylée de manière semblable à la forme membranaire (Koch, 2004).

Comme nous l'avons dit précédemment, des analyses de séquences ont permis l'identification d'une sérine 170 chez l'isoforme *Sus1* du maïs comme un second site possible de phosphorylation. Un moyen par lequel les eucaryotes contrôlent le niveau de protéines est la protéolyse régulée. Les protéasomes sont de grandes protéases multicatalytiques qui, chez les plantes comme chez les animaux, sont très présentes dans les régions en croissance active où elles dégradent sélectivement certaines protéines cytosoliques et nucléaires. (Hardin *et al.* 2003).

Selon Hardin *et al.* (2003) la phosphorylation de S170 de SuSy fonctionnerait comme un élément du mécanisme de ciblage de cette protéine vers une dégradation par le protéasome, selon le modèle suivant: La SuSy, y compris la forme activée par phosphorylation de la sérine 15 ou de son équivalent chez le peuplier et le soja, est stabilisée par la liaison d'une protéine endogène fixée au niveau de la sérine 170, qui protège donc celle-ci d'une phosphorylation par une activité kinase. Par contre, si la protéine « protectrice » est absente, la sérine 170 est susceptible d'être phosphorylée, ce qui prédispose la SuSy à la dégradation par le protéasome médiée par l'ubiquitine (Figure 13). Ceux-ci ont analysé les fragments protéolytiques de SuSy et ont observé qu'ils possédaient un assez grand nombre de sérines 170 phosphorylées. De plus, la présence de ces fragments coïncide spatialement avec l'activité du protéasome dans les feuilles en développement. La protéine SuSy phosphorylée en S170 (pS170) est moins stable que la même protéine non phosphorylée et elle est stabilisée par l'inhibition du protéasome. La conservation importante du site de phosphorylation au niveau de la sérine 170 dans les régions homologues des isoformes de SuSy des monocotylées et des dicotylées suggère que cette observation pourrait s'étendre à d'autres systèmes (Hardin *et al.*, 2003).

Le contrôle post-traductionnel du niveau de SuSy par la protéolyse dirigée par la phosphorylation de la sérine 170 peut expliquer l'importante diminution de la quantité de



1-FFT Fructane:fructane 1-fructosyltransférase
 1-SST Suc:Suc 1-fructosyltransférase

D'après Vijn *et al.* - 1999 - *Plant Physiol.* Vol. 120, (2) 351-359

Figure 14 : Synthèse d'inuline d'après Vijn *et al.*, 1999

La synthèse de l'inuline se déroule dans la vacuole et fait intervenir deux enzymes : la sucrose : sucrose 1-fructosyltransférase (1-SST) et la fructane : fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT). La SST catalyse le transfert d'un résidu fructose au départ d'une molécule de saccharose vers une autre molécule de saccharose pour former le 1-kestose (A) qui représente la molécule de base de la synthèse de l'inuline. La FFT, quant à elle, transfère des résidus fructoses d'une molécule d'inuline à une autre dans le but d'allonger ou de raccourcir les chaînes d'inuline.

SuSy qui accompagne la transition de l'hétérotrophie à l'autotrophie dans les feuilles de maïs en développement (Hardin *et al.* 2003).

1.8 SUCROSE SYNTHASE CHEZ *Cichorium intybus* L.

L'amidon et le saccharose sont les plus connus des sucres de réserve accumulés dans les végétaux supérieurs. Par contre, les fructanes, oligo- ou polysaccharides basés sur le fructose, bien que présents dans 15% des plantes à fleurs, sont moins familiers (Van Laere et Van den Ende, 2002).

Le substrat pour la synthèse des fructanes est le saccharose et, comme celui-ci, les fructanes sont stockés dans la vacuole. Bien que le saccharose soit synthétisé dans le cytoplasme, il est généralement admis que les fructanes sont synthétisés dans la vacuole, par l'action d'enzymes spécifiques, les fructosyltransférases, qui transfèrent une molécule de fructose dérivée de la dégradation du saccharose à la chaîne de fructanes en croissance. La synthèse de fructanes est modulée par la lumière, qui modifie la disponibilité du saccharose dans la cellule (Vijn et Smeekens, 1999). Dans les plantes, les fructanes peuvent avoir d'autres fonctions que le stockage : ils ont été impliqués dans la protection des végétaux face aux stress hydrique, de sécheresse ou aux faibles températures (Vijn et Smeekens, 1999).

La chicorée (*Cichorium intybus*) est une espèce bisannuelle de la famille des Astéracées cultivée en Europe, en Asie, en Afrique et en Amérique du sud et dont la racine est utilisée pour l'extraction commerciale de l'inuline, le plus simple des fructanes et un des mieux étudiés. L'inuline consiste en une chaîne de molécules de fructose terminée par du glucose. Elle est présente dans de nombreux végétaux appartenant aux familles des Astéracées et des Poacées (Graminées) (Figueira *et al.*, 2004).

Deux enzymes sont impliquées dans la synthèse de l'inuline. La première, la saccharose 1-fructosyle transférase (1-SST) catalyse le transfert d'un résidu fructose, à partir d'une molécule de saccharose vers une autre molécule de saccharose, ce qui forme un trisaccharide, le 1-kestose, qui est la plus petite molécule d'inuline aussi appelée isokestose. La seconde enzyme, une fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT) transfère des résidus fructoses d'une molécule de fructane à une autre, dans le but d'allonger ou de raccourcir les chaînes d'inuline (Vijn et Smeekens, 1999)(Figure 14). Au terme du développement de la chicorée, l'inuline représente 80% du poids frais de la racine (Druart *et al.*, 2001).

Largement analysée chez les espèces accumulant de l'amidon telles que le maïs (Carlson *et al.*, 2002) et la pomme de terre (Römer *et al.*, 2004) ou du saccharose comme la betterave (Klotz *et al.*, 2003), la sucrose synthase est par contre peu étudiée chez les plantes accumulant des polyfructanes, et en particulier chez la chicorée. Toutefois, une accumulation de fructanes a été observée en parallèle à une augmentation d'activité de SuSy dans des racines de plants de blé maintenus à 4°C (Santoiani *et al.*, 1993) et une augmentation de l'activité de la sucrose synthase a également été observée dans les racines de chicorée à partir du 53^{ème} jour après la germination (Druart *et al.*, 2001). Dans les deux cas, la forte activité de SuSy a été mise en relation avec le fait que la racine de blé, comme celle de chicorée, est un organe consommateur. Aucun rôle plus précis de la sucrose synthase n'a été évoqué.

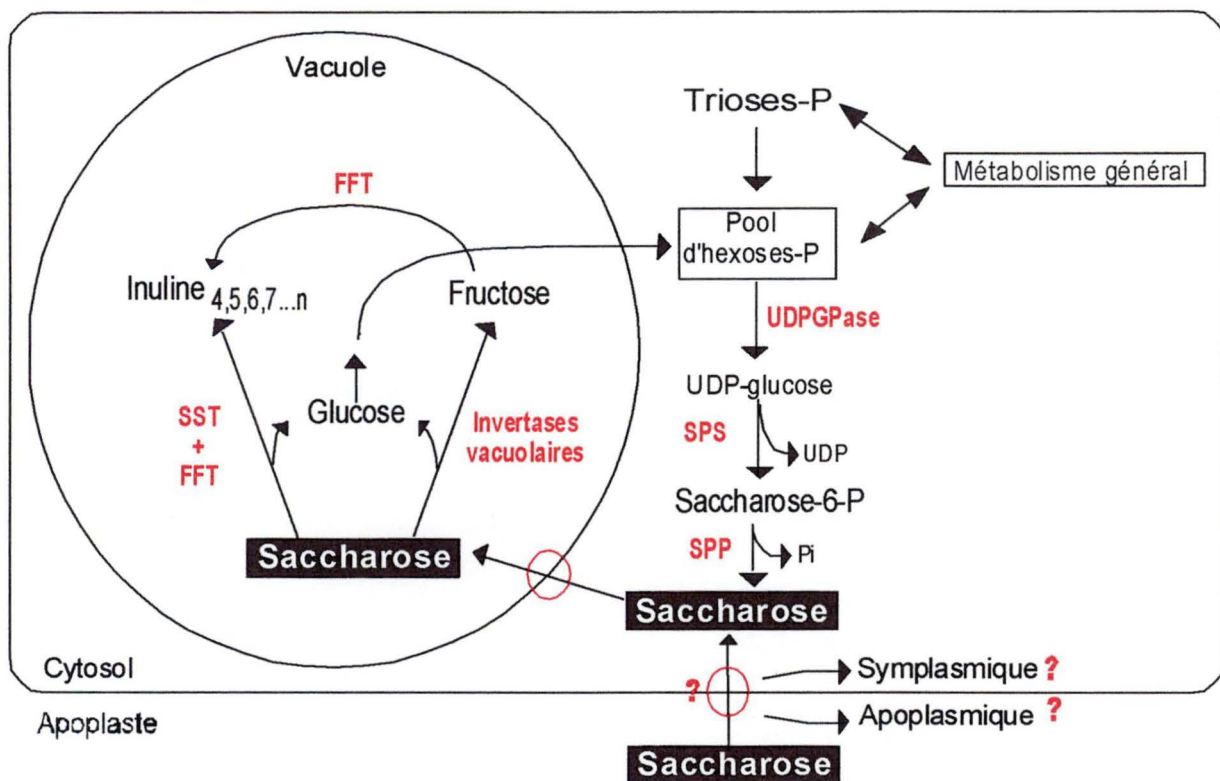


Figure 15 : Hypothèse actuelle de la synthèse d'inuline chez la chicorée. Selon celle-ci, une partie de l'UDP-glucose synthétisé dans le cytosol grâce à l'UDP-glucose pyrophosphorylase peut être transformée en saccharose via la sucrose phosphate synthase (SPS) et la sucrose phosphate phosphatase (SPP). Le saccharose peut également arriver par le phloème. Ce sucre entre alors dans la vacuole à l'aide de transporteurs spécifiques, où il sera soit utilisé pour la synthèse d'inuline, soit clivé en fructose et glucose par les invertases vacuolaires. Ce fructose peut aussi être directement utilisé par la FFT pour allonger les chaînes d'inuline (Van den Ende *et al.*, 2002).

Vu cette carence, notre laboratoire s'est intéressé à déterminer le rôle de la SuSy dans la racine de chicorée. C'est ainsi qu'Alexandre Daems a, dans le cadre de son mémoire, montré par immunomarquage de Western blots une forte présence de sucrose synthase dans des extraits protéiques de racine de chicorée alors que des extraits protéiques de feuilles de chicorée n'en contenaient pas (Daems, 2002).

D'autre part, des travaux effectués en parallèle au sein de notre laboratoire ont montré la présence d'une forte activité de dégradation de saccharose par la sucrose synthase dans des extraits protéiques préparés au départ de racines de chicorées et analysés en cup-plate. A côté de cette activité de dégradation du saccharose, une forte activité de type UDP-glucose déshydrogénase a également été observée. Cette enzyme catalyse la transformation d'UDP-glucose en UDP-acide glucuronique, ce dernier donnant lieu, après épimérisation, à de l'UDP-acide galacturonique utilisé directement pour la synthèse des pectines. Des résultats d'isoélectrofocalisation ont mis en évidence une activité de ces deux enzymes au même point isoélectrique d'environ 5,2. La forte présence d'UDP-glucose déshydrogénase dans la racine de chicorée a été confirmée par immunomarquages d'extraits protéiques de racine de chicorée analysés en Western blot (Liners *et al.*, 2003).

La forte présence de SuSy dans la racine de chicorée nous a conduits à émettre l'hypothèse d'une possible implication de cette enzyme dans la synthèse d'inuline (Daems, 2002). En effet, selon le modèle généralement admis (Van Laere et Van den Ende, 2002)(Figure 15), la synthèse d'inuline se ferait dans la vacuole, au départ de saccharose importé à partir du cytoplasme par des transporteurs spécifiques. Ce saccharose serait soit synthétisé au départ d'UDP-glucose, par l'intermédiaire de la saccharose phosphate synthase (SPS) et de la saccharose phosphate phosphatase (SPP) soit amené via le phloème, dont le déchargement, dans la racine de chicorée, serait vraisemblablement de type symplasmique (Van Laere et Van den Ende, 2002). Dans ce modèle, du glucose est libéré lors de la synthèse de 1-kestose par la SST ainsi que lors de l'ajout de chaque résidu fructose au cours de l'allongement des chaînes d'inuline par la FFT. Si tout le saccharose est converti en inuline par l'intervention de la SST et de la FFT, l'incorporation de chaque fructose dans la chaîne de fructane va nécessiter 1,5 ATP pour le recyclage du glucose en tant que sous produit de l'hydrolyse du saccharose (Van Laere et Van den Ende, 2002). Si l'on prend l'exemple de la synthèse d'une molécule d'inuline standard (longueur moyenne comprise entre 30 et 50 résidus fructose (Vijn et Smeekens, 1999)) contenant 40 résidus fructoses (Glu-Fru-Fru-Fru₃₈), selon ce modèle, 39 molécules de glucose seraient libérées et devraient être recyclées.

Nettement moins coûteux d'un point de vue énergétique pour le végétal, notre modèle alternatif (Figure 16) implique l'intervention de la sucrose synthase dans la synthèse de l'inuline de la manière suivante : le saccharose provenant d'un déchargement symplasmique du phloème serait clivé en UDP-glucose et fructose par une SuSy cytoplasmique. Comme chez la tomate (Nguyen-Quoc et Foyer, 2001) le fructose entrerait dans la vacuole par l'intermédiaire d'un transporteur et serait ainsi directement utilisable par la FFT pour l'allongement des chaînes d'inuline. En effet, il a été démontré que la FFT pouvait elle-même directement utiliser le fructose pour la synthèse d'inuline (Van den Ende *et al.*, 2002). Contrairement au modèle précédent, le nombre de molécules de glucose à recycler suite à la synthèse d'inuline est dans ce cas nettement plus faible : il n'y aurait libération de glucose dans la vacuole que lors de la synthèse de 1-kestose par la SST au départ de deux molécules de saccharose, l'allongement de la chaîne ne provoquant aucune accumulation de glucose supplémentaire. Si l'on considère l'exemple de la synthèse de la molécule d'inuline

contenant 40 résidus fructoses (Glu-Fru-Fru-Fru₃₈), selon notre modèle, 1 seule molécule de glucose serait libérée et devrait être recyclée. De plus, l'UDP-glucose provenant de la dégradation du saccharose par la SuSy cytoplasmique pourrait soit retourner dans le pool d'hexoses phosphates, par l'intermédiaire de l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UDPGPase), en générant de l'énergie sous forme d'UTP, soit servir à la synthèse du saccharose par l'intermédiaire de la SPS et de la SPP. Le saccharose permettant l'initiation de la synthèse d'inuline serait, comme dans le modèle généralement admis, directement importé dans la vacuole à partir du cytoplasme par des transporteurs spécifiques.

Si notre modèle nous apparaît comme tout à fait plausible, des éléments de réponse restent cependant à apporter afin de le valider. Ainsi, deux aspects ont plus particulièrement retenu notre attention : Quelle est la localisation tissulaire de la SuSy de la chicorée ? Quel est l'effet d'une inhibition de la production de SuSy sur le métabolisme de l'inuline dans la racine de chicorée ? La littérature n'apporte à l'heure actuelle aucune réponse à ces questions chez la chicorée, des études d'immunolocalisation de SuSy ont été réalisées chez d'autres espèces pour lesquelles des mutants SuSy ont également été générés.

1.9 Immunolocalisation de la sucrose synthase

Différentes études d'immunolocalisation ont été réalisées notamment chez le maïs (Brangeon *et al.*, 1996) et chez le ricin (Wachter *et al.*, 2003).

Nolte et Koch (1993) ont localisé la SuSy au niveau des cellules compagnes de vaisseaux de petites tailles et de vaisseaux de taille moyenne dans les feuilles matures de maïs et de citron, en utilisant des anticorps polyclonaux produits contre une combinaison des isoformes *Sh1* et *Sus1* (Koch *et al.*, 1992). De plus, dans le citron, une présence importante de SuSy a pu être observée au niveau des zones de déchargement du phloème.

Wittich et Vreugdenhil (1998) ont utilisé ces mêmes anticorps anti-SuSy dans le maïs. L'isoforme *Sh1* a ainsi été localisée dans le cytoplasme des cellules de stockage de l'endosperme, l'isoforme *Sus1* a, elle, été observée dans le cytoplasme des cellules de l'aleurone et dans les embryons en développement.

Ces anticorps ont encore été utilisés pour localiser SuSy dans la tumeur induite par *A.tumefaciens* chez le ricin (Wachter *et al.*, 2003) et ont permis de montrer que la sucrose synthase était principalement localisée dans la périphérie de la tumeur plutôt que dans le centre. La SuSy a été particulièrement observée au niveau des vaisseaux individuels de la tumeur, au niveau du parenchyme périphérique et dans les cellules compagnes du phloème.

Des anticorps de lapin dirigés contre des SuSy purifiées à partir de feuilles de maïs en développement, ont été utilisés pour déterminer l'expression spatiale et temporelle de la SuSy dans les feuilles de maïs en développement. La sucrose synthase a été localisée au niveau du cytoplasme des cellules méristématiques en division dans les cellules des zones d'élongation ainsi que dans les cellules différenciées des jeunes tissus photosynthétisants. Les tissus matures présentaient un marquage nettement plus faible essentiellement limité aux cellules de garde des stomates et aux cellules compagnes du phloème (Brangeon *et al.*, 1996).

Enfin, des anticorps dirigés contre une SuSy du « *vigna radiata* » et produits par des lapins ont également été utilisés d'une part chez le radis (Rouhier et Usuda, 2001) chez qui ils ont permis de localiser la sucrose synthase au niveau des cellules compagnes du phloème mais

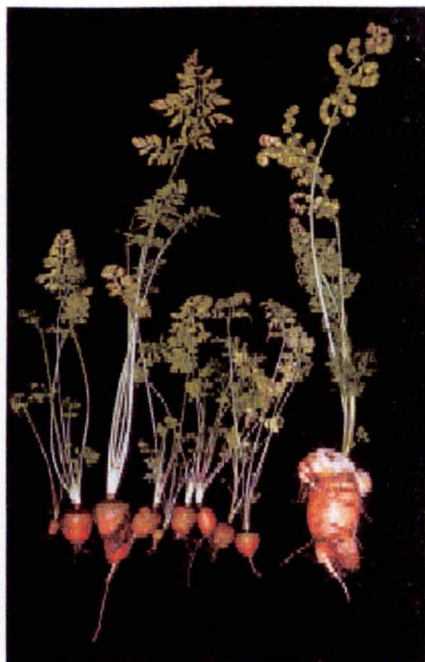


Figure 17 : Influence de l'introduction d'une construction d'ARNm de sucrose synthase sur le développement de carottes transgéniques. Une nette diminution de taille de la racine et des feuilles caractérise ces plants transgéniques (à gauche) comparés à une plante contrôle (à droite) d'après Sturm et Tang (1999).

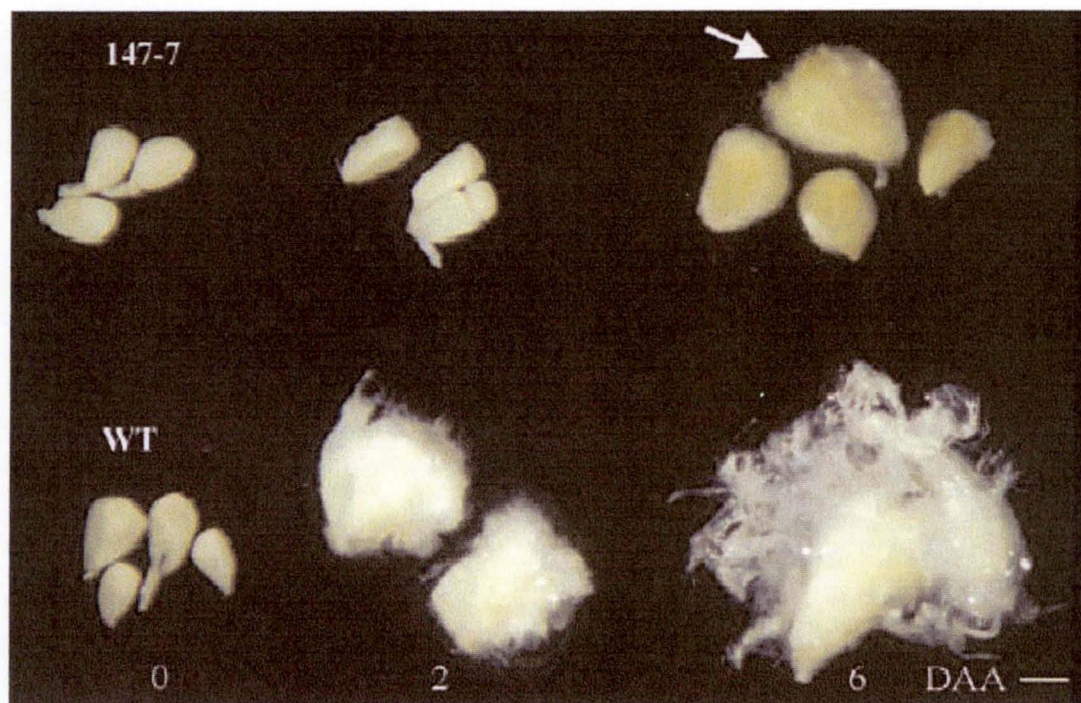


Figure 18 : Effets de la suppression de la SuSy dans l'épiderme de l'ovule de coton. Cette suppression réprime l'initiation et l'élongation des fibres de coton. Une différence significative apparaît dès le deuxième jour après l'anthèse (DAA): les graines sauvages (WT) sont recouvertes de jeunes fibres tandis que les graines transgéniques '147-7) restent nues. Cette différence est encore plus marquée après 6 jours, bien que quelques fibres apparaissent sur les graines transgéniques d'après Ruan *et al.* 2003.

également dans le parenchyme du xylème ainsi que dans des cellules corticales et d'autre part pour purifier deux isoformes SSI et SSII chez la poire du Japon (Tanase et Yamaki, 2000).

1.10 Generation de mutants SuSy

La littérature fait état de différents types de mutants pour des isoformes de la sucrose synthase, notamment chez la tomate, la pomme de terre, la carotte, le maïs, le coton et le pois.

Ainsi, l'implication de la sucrose synthase dans la synthèse de l'amidon a été étudiée dans de jeunes fruits de tomate en développement (Chengappa *et al.*, 1999). Une construction antisens, placée sous le contrôle d'un promoteur actif en début de développement uniquement et spécifique des fruits, a été utilisée pour réduire la synthèse de sucrose synthase et permettre d'en observer les effets. L'activité de SuSy a été ainsi réduite de 99% dans les jeunes fruits et cela sans affecter l'accumulation en amidon ou en sucre.

Des pommes de terre transgéniques ont été générées en exprimant un ARN correspondant à une isoforme de SuSy en antisens. Bien qu'un promoteur constitutif 35S CaMV ait été utilisé pour diriger l'expression de cet ARN antisens, l'inhibition de l'activité SuSy était limitée aux tubercules, indiquant par là que des isoformes de SuSy indépendantes les unes des autres étaient responsables des diverses activités de type sucrose synthase dans les différents organes de la pomme de terre (Zrenner *et al.*, 1995). Dans les tubercules transgéniques en développement, la diminution d'activité de la sucrose synthase variait de 38 à 50% et était accompagnée d'une réduction du contenu en amidon de l'ordre de 34 à 63%. Cette observation confirme donc l'hypothèse selon laquelle la SuSy est la seule enzyme dont l'activité soit suffisante pour assurer la dégradation du saccharose nécessaire à la production d'amidon *in vivo* dans les tubercules de pomme de terre en croissance (Zrenner *et al.*, 1995).

La figure 17 présente les effets de l'introduction de la construction antisens chez la carotte. La réduction de l'activité SuSy, de plus de 90%, ainsi obtenue entraîne une plus faible accumulation d'amidon et de cellulose. En effet, Sturm et Tang ont pu mettre en évidence d'importantes différences de taille entre les feuilles et les racines des plants transgéniques par rapport aux plants sauvages. Ces résultats leur ont permis de suggérer que chez la carotte, la sucrose synthase était un déterminant majeur de la croissance de la plante plus que de la répartition du carbone (Sturm et Tang, 1999).

Des transgènes ciblant les isoformes Sh1 et Sus1 soit séparément, soit ensemble, ont été générés. Des graines de mutants *sh1*, c'est-à-dire délétés pour l'isoforme Sh1 présentent une déficience moyenne d'accumulation de l'amidon. Elles contiennent en effet 78% de la quantité d'amidon d'un individu sauvage mais surtout les cellules de stockage de ces graines sont dégénérées suite à une réduction de la synthèse de cellulose. Par contre, aucun changement phénotypique n'est observé chez les mutants *sus1*, ce qui serait dû à un effet compensatoire produit par la grande quantité de protéine Sh1. Les double-mutants *sh1-sus1* accumulent moins d'amidon (53%) que les graines *sus1*. Ainsi, l'isoforme Sh1 fournirait principalement le substrat pour la synthèse de la cellulose tandis que l'isoforme Sus1, elle, formerait plutôt les précurseurs pour la production d'amidon (Sturm et Tang, 1999).

Des plants de coton ont été transformés avec une construction antisens supprimant l'expression du gène SuSy. La suppression de 70% de l'activité de SuSy dans l'épiderme de

l'ovule était accompagnée d'un phénotype caractérisé par une diminution de la production de fibres de coton (Figure 18). Le niveau de suppression de SuSy était en corrélation avec le degré d'inhibition de l'initiation et de l'élongation des fibres de coton (Ruan *et al.*, 2003). C'est sur base de ces résultats qu'on a attribué à la sucrose synthase un rôle dans l'initiation et l'élongation des fibres de coton.

Afin d'étudier le rôle de la sucrose synthase dans la nodulation, un mutant *Rug4-a* délété pour la protéine Sus1 suite à la substitution d'une leucine par une phenylalanine à la position 164, a été utilisé, celui-ci est caractérisé par une diminution du niveau de SuSy de 95% dans les graines de pois et dans les nodules et, en parallèle, par une inhibition de la fixation d'azote dans le nodule (Koch, 2004).

Dans le cadre de ce travail, nous avons entrepris de nous intéresser à ces deux aspects en tirant parti d'outils présents au laboratoire : d'une part un polysérum dirigé contre une forme recombinante de SuSy d'*A. thaliana* (SUS1) et d'autre part, de la technique ARNi mis au point par M. Draye dans le cadre d'un projet « fraise » financé par le ministère wallon de l'Agriculture.

1.11 L'ARN interférent

Les cellules eucaryotes suppriment les éléments génétiques étrangers par un mécanisme de dégradation spécifique des ARN ciblés. Ce mécanisme de contrôle post-transcriptionnel de l'expression des séquences cibles dégrade tout ARN cytoplasmique ayant une forte homologie avec la séquence initialement introduite dans la cellule. C'est un système qui peut être assimilé à une forme de défense agissant au niveau des ARN's. La fonction naturelle de la suppression semble être liée à la protection du génome contre l'invasion par des éléments génétiques mobiles tels que les transposons et les virus qui sont connus pour produire des ARN aberrants ou double brins lorsqu'ils s'expriment dans la cellule hôte. Un mécanisme similaire, le PTGS (post-transcriptional gene silencing), existe également chez les plantes celui-ci est induit par un transgène.

Fire *et al* (1998) ont découvert que l'introduction d'ARN double brin dans des cellules de *C. elegans* pouvait réduire spécifiquement l'expression de protéines en se liant à leurs ARN messagers (ARNm) : c'est le phénomène d'ARN interférence. Le phénomène d'ARN « silencing », connu sous le nom de « post-transcriptional gene silencing » (PTGS) chez les plantes, quelling chez les levures et interférence à l'ARN chez les animaux indique qu'ils partagent un mécanisme commun.

L'ARN interference (RNAi) est un phénomène dans lequel l'introduction d'ARN double-brin (ARNds) dans une cellule provoque la dégradation des ARNm complémentaire (Figure 19, point 1). Dans la cellule, la longue molécule d'ARNds est clivée en plus petites molécules de 21 à 25 nucléotides, appelés petits ARNs interférents ou siARNs, par une ribonucléase appelée Dicer (Figure 19, point 2). Les siARN s'assemblent ensuite avec différents composés protéiques pour former un complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Un fois activé, le complexe RISC se lie au transcrit complémentaire par appariement des bases entre le brin siARN antisens et la molécule d'ARNm. L'ARNm lié est clivé (Figure 19, point 4) et la dégradation de la séquence spécifique de l'ARNm (Figure 19, point 5) aboutit au gène silencing.

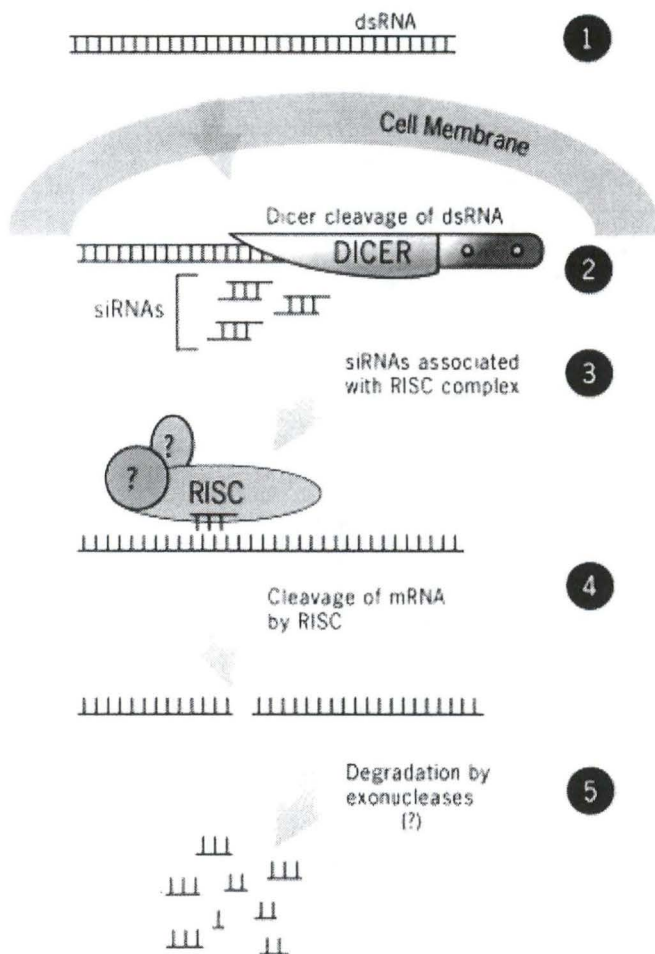


Figure 19 : Fonctionnement classique de la machinerie de l'ARN interférence. L'ARN double brin est reconnu et clivé par Dicer en siARN et miARN. Ces petits ARN se lient ensuite à RISC formant ainsi un complexe, activé par de l'ATP, qui se lie à l'ARNm cible.

La technique de l'ARN interférent développé par les cellules eucaryotes peut être utilisée comme outil de la biologie moléculaire permettant de trouver la fonction d'un gène en déjouant son expression. Ce mécanisme peut se faire selon deux approches : soit la synthèse enzymatique des ARN bicaténaire courts (21 à 23 nucléotides de long), les ARN interférents, et leur pénétration dans une cellule ou un tissu pour suivre l'effet inhibiteur sur le gène cible ou l'expression d'un ARN interférent grâce à un vecteur d'expression. Cet ARN interférent est formé à partir d'un ARN contenant deux séquences complémentaires séparées par une courte séquence qui permet le repliement et l'appariement. Nous produisons ainsi un ARN bicaténaire court, replié, qui permet d'induire chez les eucaryotes différents processus conduisant au silencing de gènes c'est-à-dire à l'extinction de leur expression, notamment par la dégradation de l'ARN messager complémentaire. Ce phénomène nommé ARN interférence passe par l'intermédiaire de petits ARN interférents (siARN, small interferent RNA).

I.12 OBJECTIFS DE CE MEMOIRE.

Ce mémoire fait suite aux travaux déjà effectués ou en cours de réalisation au laboratoire et a pour but de contribuer à vérifier l'implication de la sucrose synthase dans la synthèse d'inuline dans la racine de chicorée, et cela en suivant deux approches : la première consiste en une approche immunocytochimique dont le but est de permettre la localisation tissulaire de la sucrose synthase dans la racine de chicorée, tandis que la seconde a pour but la suppression de la sucrose synthase dans la racine de chicorée par la construction d'une structure d'ARN interférence de façon à voir si cela interfère avec la synthèse d'inuline.

MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

II.1 Marquage de « tissues Prints »

Matériel : Membrane PVDF : membrane de polyvinylidene fluoride hydrophobe, (Hybond-P PVDF membrane AMERSHAM Biosciences),

Tampon TBS (Tris buffer saline) : 20mM Tris HCl- 137mM NaCl (pH 7,6), Tampon TBST: TBS + 0,1% de Tween 20,

Agent bloquant: Tampon TBST + 5% de poudre de lait,

Rouge Ponceau S (SIGMA) : 0,1% Ponceau S, 5% acide acétique,

Anticorps primaires : - polysérum de lapin anti sucrose synthase recombinante (1,34 mg d'IgG/ml), polysérum de lapin anti UDP-glucose déshydrogénase 5^{ème} rappel (2,6 mg/ml)

Anticorps secondaires : Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline (SIGMA).

Révélant : Tampon de révélation (0,1M Tris HCl ; 0,05 M MgCl₂) pH 9,5

4-Nitrobleu Tetrazolium Chloride 100 mg/ml (NBT, Roche)

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate 50 mg/ml (BCIP, Roche)

Protocole :

1) Découper un morceau de membrane PVDF correspondant au diamètre de la racine de chicorée.

2) Incuber la membrane de PVDF 5 secondes dans le méthanol et ensuite directement 5 min dans de l'eau désionisée.

3) Procéder au transfert des protéines de la racine vers la membrane PVDF en pressant la racine, coupée au couteau, sur la membrane pendant une minute. Laisser sécher la membrane 5 min avant de la couper en 4 parties semblables et de mettre les ¾ de celle-ci à incuber pendant 1 heure dans l'agent bloquant, sous agitation, à 25°C. Cette étape de saturation empêche une fixation anarchique des anticorps sur la membrane. Le dernier quart de membrane sert à vérifier la qualité du transfert protéique : incuber le morceau 3 min dans la solution de Rouge Ponceau S avant de le rincer deux fois dans de l'eau désionisée et de le laisser sécher sur papier absorbant.

4) Après l'incubation dans l'agent bloquant, laver les membranes sous agitation dans du TBST selon la séquence suivante : 1x2 min, 1x15 min, 1x5 min.

5) Incuber un quart de la membrane une nuit à 4°C, sous agitation dans les anticorps primaires dilués de manière appropriée dans le TBST. Incuber le 3^{ème} quart dans du TBST seul pour le contrôle de la fixation non spécifique des Ac secondaires.

Dans le cas d'un contrôle de la spécificité de l'anticorps primaire pour la protéine ciblée : incuber les polysérums (dilués dans le TBST) avec des protéines purifiées recombinantes pendant 30 minutes, centrifuger 10 minutes à 3500 rpm et utiliser le surnageant pour l'incubation des « tissue-prints ».

6) Laver les membranes selon la séquence présentée en 4.

7) Incuber les membranes pendant une heure à 25°C, sous agitation, dans l'anticorps secondaire dilué 5000 x dans du TBST.

8) Laver la membrane selon la séquence présentée en 4.

9) Pour 15 ml de tampon de révélation, mettre 75 µl de NBT et 56,3 µl de BCIP. Essuyer les membranes quelques secondes sur un papier absorbant avant la révélation réalisée en incubant les membranes 5 min dans le tampon de révélation contenant du NBT et du BCIP. Arrêter la réaction en rinçant la membrane quelques secondes dans de l'eau désionisée et laisser sécher ensuite sur papier absorbant.

II.2 Préparation des milieux

Un milieu LB est un milieu de croissance riche, non sélectif, convenant à de nombreuses espèces de bactéries (11)

Bactotryptone	10g
Yeast extract	5g
NaCl	10g

Ampicilline (Sigma), stock : 100 mg/ml en H₂O (filtré sur 0,2µm et conservé à -20°C).

Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), stock 100mM en H₂O (filtrée sur 0,2µm et conservée à -20°C).

Porter à pH 7.

Pour un milieu LB agar, ajouter 15g d'agar.

II.3 Préparation de stocks de bactéries

Matériel :

Milieu LB-agar (cfr II.2), Ampicilline (Sigma), stock : 100mg/ml en H₂O, (filtrée sur 0,2µm et conservée à -20°C), Bactéries BL21DE3 contenant le plasmide pET17b-SuSy, Bactéries BL21DE3 contenant le plasmide pET17b-UDP-glucose déshydrogénase.

Protocole :

- 1) Préparer 100ml de milieu LB + agar, l'autoclaver et le placer dans un bain à 50° pendant 30 min.
- 2) Ajouter l'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/ml.
- 3) Couler le milieu dans les boîtes de pétri et laisser refroidir avant de strier les bactéries.
- 4) Incuber une nuit dans l'étuve à 37°C.
- 5) Stocker ces boîtes à 4°C.

II.4 Expression de SuSy et d'UDP-glucose déshydrogénase en bactéries.

Matériel :

Milieux LB liquide (cfr II.2)

Protocole :

- 1) Préparer 12 ml de milieu LB + ampicilline à une concentration finale de 100 µg/ml.
- 2) Ensemencer ce milieu avec une colonie de bactéries BL21DE3 contenant le vecteur pET recombinant (pET17b-SuSy ou pET17b-UDP-glucose déshydrogénase).
- 3) Incuber à 37°C sous agitation.
- 4) Quand la suspension bactérienne a atteint une DO 600 nm comprise entre 0,4 et 0,6, scinder la culture en deux. Ajouter dans 4 ml de la suspension, de l'IPTG à une concentration finale de 1mM de manière à induire la production des protéines recombinantes. Les 4 ml restant servent de contrôle non induits.
- 5) Incuber à 37°C sous agitation pendant 3 heures.
- 6) Prélever 500µl de la suspension bactérienne « induite » et de la suspension contrôle « non induite » pour l'extraction des protéines.

II.5 Extraction protéique.

Matériel : Tampon de chargement (5x): Tris 250mM, DTT 500mM, SDS 10%, β-Mercaptoéthanol 10%, Glycérol 50%,

Sonicateur « Bandelin sonoplus » HD 2070 (Bandelin electronic, Germany)

Protocole :

- 1) Centrifuger 500µl de suspension bactérienne à 13000 rpm pendant 5 min à 4°C.
- 2) Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 50 µl de tampon de chargement 1x.
- 3) Chauffer les échantillons pendant 10 min à 100°C et les conserver sur glace.
- 4) Casser les bactéries par sonication à une puissance de 40% pendant 1 minute.

- 5) Mettre l'échantillon pendant 5 min à -20°C.
- 6) Prélever 10µl des bactéries broyées pour l'analyse des protéines en gel SDS-PAGE.

II.6 Culture de bactérie pour isoler la protéine d'intérêt par le « T7-Tag affinity purification kit » (Novagen).

Matériel : Milieu LB-agar (cfr II.2).

Protocole :

- 1) Préparer 12ml de milieu LB + ampicilline à une concentration finale de 100µg/ml.
- 2) Ensemencer ce milieu avec une colonie de bactéries BL21DE3 contenant le vecteur pET recombinant (pET17-SuSy ou pET17-UDP-glucose déshydrogénase).
- 3) Incuber à 37°C sous agitation (250 rpm) et laisser pousser jusqu'à ce que la DO.600 nm de la culture soit comprise entre 0,4 et 0,6.
- 4) Transférer la culture une nuit à 4°C.
- 5) Centrifuger 30 secondes, à 4°C, à 4000 rpm et resuspendre le culot dans 4 ml de milieu frais.
- 6) Ensemencer 100 ml de milieu LB contenant 100µg/ml d'ampicilline avec cette pré-culture.
- 7) Incuber à 37°C sous agitation et ajouter l'IPTG à une concentration finale de 1mM quand la DO.600 nm a atteint une valeur comprise entre 0,4 et 0,6.
- 8) Incuber les bactéries 3 heures à 37°C sous agitation.
- 9) Centrifuger 5 min à 4°C à 5500 rpm pour récupérer les bactéries.

II.7 Extraction des protéines contenues dans les corps d'inclusion.

Matériel : Kit « T7-Tag affinity purification »(Novagen) : Tampon Bind/Wash T7-Tag (10x) : Na₂HPO₄ 42,9mM, KH₂PO₄ 14,7mM ; KCl, 27mM ; Tween-20 1% ; Azide de sodium 0,02% pH 7,3

Membrane de porosité de 0,45µm (Millipore)

Sonicateur « Bandelin sonoplus » HD 2070 (Bandelin electronic, Germany)

Protocole:

- 1) Centrifuger 5 min à 4°C à 5500 rpm pour récupérer les bactéries.
- 2) Eliminer le surnageant, laisser sécher le culot et le reprendre dans 10 ml de tampon Bind/Wash (1x) sans urée.
- 3) Mettre l'échantillon sur glace et soniquer les bactéries 3x1 minute à une puissance de 40%.
- 4) Centrifuger 15 min à 4°C à 13000 rpm pour récupérer les corps d'inclusion.
- 5) Resuspendre le culot dans 5 ml de tampon Bind/Wash (1x) sans urée.
- 6) Soniquer 3 x 1 minute à une puissance de 40%.
- 7) Centrifuger 15 min à 4°C à 13000 rpm, éliminer le surnageant et laisser sécher le culot quelques min.
- 8) Resuspendre le culot dans 10 ml de tampon Bind/Wash (1x) contenant 6 M urée. Incuber sur glace pendant 1 heure pour solubiliser totalement les protéines.
- 9) Centrifuger 20 min à 4°C, à 18000 rpm pour éliminer les composants insolubles.
- 10) Filtrer le surnageant à travers une membrane de 0,45µm. Réserver 50µl de ce filtrat pour vérifier ultérieurement la qualité de l'extraction par gel SDS-PAGE.
- 11) Diluer l'extrait avec du tampon Bind/Wash (1x) pour ramener la concentration en urée à 2M avant son chargement sur la colonne d'affinité.

II.8 Purification des protéines avec le « T7-Tag Affinity Purification Kit ».

Matériel : Kit « T7-Tag affinity purification » (Novagen),

Tampon Bind/Wash T7-Tag (10x) : Na_2HPO_4 42,9mM, KH_2PO_4 14,7mM, KCl 27mM, Tween-20 1%, Azide de sodium 0,02% pH 7,3,

Tampon d'élution (10x): acide citrique 1M (pH2,2),

Tampon de neutralisation (1x) : Tris 2M (pH10,4)

Protocole :

1) Mettre la colonne de chromatographie sur un support approprié et déposer 5ml de tampon Bind/Wash (1x) laissé à température ambiante, afin d'éliminer toute trace de bulles d'air dans le verre fritté.

2) Laisser la résine T7 tag antibody agarose s'équilibrer à température ambiante et la déposer entièrement sur la colonne de chromatographie.

3) Equilibrer la résine par lavage avec 10 ml de tampon Bind/Wash (1x) et charger ensuite l'échantillon protéique (± 30 ml) maintenu à température ambiante.

4) Laver la colonne avec 10 ml de tampon Bind/Wash (1x).

5) Préparer et numéroter 5 tubes Eppendorf contenant 150 μl de tampon de neutralisation.

6) Eluer la protéine retenue sur la colonne avec 5 fois 1 ml de tampon d'élution (1x), récolter ± 1 ml par Eppendorf et mélanger immédiatement le contenu de chaque tube par inversion afin d'homogénéiser l'éluat et le tampon de neutralisation. Placer les tubes sur glace au fur et à mesure de l'élution et les conserver ensuite à -20°C .

7) Laver la colonne avec 10 ml de tampon Bind/Wash (1x). Mettre les bouchons de part et d'autre de la colonne et la stocker à 4°C , ainsi que les tampons.

II.9 Analyse des protéines par électrophorèse en gel SDS-PAGE (méthode de Laemmli)

Les protéines extraites des souches bactériennes sont analysées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS. Ce type de gel est le résultat de la polymérisation de monomères d'acrylamide et de bis-acrylamide. Les deux catalyseurs que sont l'APS et le TEMED induisent la polymérisation des monomères en libérant des radicaux libres.

Le gel d'acrylamide, ainsi que le tampon, contiennent du SDS, un détergeant qui, en excès, et en présence de β -Mercaptoéthanol (un réducteur de ponts disulfures), va dérouler les protéines et les charger négativement de manière uniforme. Les protéines étant toutes chargées négativement, leur migration dans le gel sera inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

Matériel : Tampon de chargement (5x) : Tris 250mM, DTT 500mM, Sodium dodecyl sulfate 10% (SDS, Sigma), β -Mercaptoéthanol 10%, Glycérol 50%, Bleu de Bromophénol 0,25% (pH 6,8) ; Amonium persulfate 98% (APS, Sigma) ;

N,N,N',N'-tetraméthyl-éthylènediamine (TEMED, Sigma) ;

Sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma) ; Tampon d'électrophorèse : Tris-HCl 25mM (pH 8,3), Glycine 250mM, SDS 0,1%,

Cuve d'électrophorèse : Mini- PROTEAN II and ready gel accessories (Bio-Rad, 165-2944) et Protean II xi cell (Bio-Rad, 165-1814).

Etalon de poids moléculaire : precision protein standards (Bio-Rad, 161-0373) : 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa, Solution de coloration: Bleu de Coomassie Brillant Blue R250 0,1%, Méthanol 40%, H_2O 50%, acide acétique 10% Solution de décoloration : acide acétique 10%, Méthanol 40%, H_2O . Gel-Air-Dryer (Bio-Rad)

Protocole:

Préparer les gels d'empilement et de migration selon les proportions suivantes:

	Gel de migration 8% Running gel (10 ml)	Gel d'empilement 5% Stacking gel (5 ml)
H ₂ O	4,6 ml	3,4 ml
Mix acrylamide 30%	2,7 ml	0,83 ml
Tris*	2,5 ml	0,63 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,05 ml
APS 10%	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,006 ml	0,005 ml

* Tampon Tris 1,5M (pH 8,8) pour le running gel et Tampon Tris 1M (pH 6,8) pour le stacking gel.

Monter les plaques d'électrophorèse sur les supports ; ces plaques sont séparées par des spaceurs de 0,75 mm d'épaisseur. Couler le gel de migration entre les deux plaques de verre ; ajouter un peu d'éthanol pour favoriser la polymérisation. Eliminer l'éthanol après la polymérisation (± 30 min), placer le peigne et couler le gel d'empilement. Après polymérisation complète du gel d'empilement (± 30 min), placer le gel dans la cuve remplie de tampon d'électrophorèse, enlever le peigne et rincer les puits avec quelques ml de tampon d'électrophorèse.

Chargement des échantillons : Les protéines soumises à l'électrophorèse sont directement solubilisées dans un tampon de chargement (5x) dans les proportions 1/5 de bleu pour 4/5 d'échantillon. Les protéines sont préalablement chauffées 10 min à 100°C et conservées sur glace jusqu'au dépôt sur gel.

Migration : L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 150V pour les gels de dimension 7x10 cm pendant 45 à 50 min.

Détection des protéines : Après la migration électrophorétique, le gel est retiré de son support de verre et placé dans la solution de coloration pendant 30 min. Afin de visualiser les protéines, on décolore progressivement le gel avec la solution de décoloration.

Conserver ensuite le gel dans de l'eau désionisée avec 10% de glycérol en attendant le séchage avec le Gel-Air-Dryer.

II.10 Dosage des protéines par le « Kit NanoOrange Protein Quantification »

Matériel : NanoOrange Kit (N-666, Molecular probes)

- NanoOrange protein quantification « reagent » (500x stocké à -20°C à l'obscurité).
- NanoOrange protein quantification « diluent » (10x stocké à température ambiante).
- Bovine serum albumine (BSA) standard (stockée à -20°C)

Spectrofluorimètre AMINCO-Bowman série 2.

Protocole :

- 1) Préparer du diluent 1x sachant que 2,5 ml sont nécessaires par échantillon à doser..
- 2) Préparer la « working solution » en diluant 500x le « reagent » dans le « diluent » 1x, bien homogénéiser et protéger l'ensemble de la lumière.
- 3) Préparer la gamme d'étalon de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ à 0,6 $\mu\text{g/ml}$ de BSA diluée dans la « working solution » selon les proportions suivantes :

Volume de solution BSA	Volume de working solution (1x)	Concentration finale en BSA
0ml	2,50ml	0 $\mu\text{g/ml}$
1,50ml de 1 $\mu\text{g/ml}$	1,00ml	0,6 $\mu\text{g/ml}$
0,75ml de 1 $\mu\text{g/ml}$	1,75ml	0,3 $\mu\text{g/ml}$

0,25ml de 1µg/ml	2,25ml	0,1µg/ml
1,5ml de 0,1µg/ml	1,00ml	0,06µg/ml
0,75ml de 0,1µg/ml	1,75ml	0,03µg/ml
0,25ml de 0,1µg/ml	2,25ml	0,01µg/ml

- 4) Prélever 100 µl de chacun des échantillons à doser.
- 5) Ajouter 2,4 ml de « working solutions » sur les 100 µl d'échantillon, vortexer et faire chauffer 10 minutes entre 90 et 96°C en protégeant de la lumière.
- 6) Laisser revenir à température ambiante pendant 20 min, à l'abri de la lumière.
- 7) Pour la mesure, exciter la solution à 485 nm et mesurer l'émission à 590 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre.
- 8) Déterminer la concentration en protéines de l'échantillon à partir de la droite de régression obtenue.

II.11 Fixation de fragments de racine de chicorée

Matériel : Tampon de fixation : NaPO₄ 0,1M pH 6,8 ; 0,05M sucrose ; 4% paraformaldéhyde ; 0,2% glutaraldéhyde.

Ethanol 100% , Résine LR White (London Resin Company Ltd)
et Gelules de gelatine

Protocole :

Fixation : Découper au scalpel de très fines tranches de racine de chicorée. Dans le tampon de fixation, couper ces morceaux en petits carrés de 1 mm de côté et placer ces dernières dans le tampon de fixation pendant 4 heures à 4°C ou 4 heures à 25°C.

Faire deux lavages dans le tampon phosphate 0,1M pH 6,8 contenant 0,05M sucrose à 4°C ou à 25°C pendant 15 min et 2 lavages dans le même tampon à température ambiante pendant 15 min.

Placer les échantillons 30 min dans de l'eau à température ambiante.

Déshydratation : Pour remplacer l'eau par l'éthanol qui est le solvant de la résine, réaliser les bains à température ambiante selon le tableau suivant :

15 min	Ethanol 30% dans de l'eau
15 min	Ethanol 50% dans de l'eau
15 min	Ethanol 70% dans de l'eau
15 min	Ethanol 80% dans de l'eau
15 min	Ethanol 90% dans de l'eau
30 min	Ethanol 100%

Remplacer l'éthanol 100% par de l'éthanol 100% frais et laisser une nuit à 4°C.

Infiltration : Pour remplacer l'éthanol par de la résine, faire 3 bains de 2 heures chacun à température ambiante, dans les mélanges (Vol/Vol) éthanol/ LR White 2 :1, 1 :1 et 1 :2. Ces bains sont effectués sous agitation dans les fioles fermées.

Mettre ensuite les échantillons dans la résine pure pendant une nuit à 4°C, en laissant la fiole ouverte pour permettre l'évaporation de l'éthanol résiduel.

Remplacer la résine et effectuer un dernier bain d'1 h à température ambiante sous agitation.

Mettre ces échantillons dans le fond de gélules en gelatine, remplir ces dernières de résine et les recouvrir d'une lamelle de verre pour éviter le contact avec l'oxygène de l'air.

Laisser la résine polymériser pendant 6 heures à 60°C.

II.12 Marquage de coupes de racines de chicorée.

Matériel : Anticorps secondaires anti-lapin, couplés au fluorochrome Alexa 488, Mowiol, Tampon TBS: 20mM Tris HCl pH 7,6 ; 137mM NaCl

Tampon TBST: TBS + 0,1% de Tween 20,

Agent bloquant: Tampon TBST + 5% de poudre de lait,

Anticorps primaires : polysérum de lapin anti sucrose synthase recombinante (1,34mg d'IgG/ml)

Protocole :

Les marquages des coupes ont été effectués de manière similaire aux tissue prints (cfr II.1). Ces coupes ont ensuite été montées avec du Mowiol pour garantir une meilleure conservation du marquage. L'observation des coupes a été faite à l'aide d'un microscope confocal grâce à la collaboration de C. Demazy (URBC).

II.13 Purification des Ac anti-UDP-glucose déshydrogénase

Matériel : Solution saturée en sulfate d'ammonium 800g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /L d'eau à 25°C

PBS : (100mM NaCl, 33mM NaH_2PO_4 , 17mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pH 7,2.

Colonne Protein A-Sepharose 4B Fast Flow (Sigma P-9424),

Tampon A : 0,02M NaH_2PO_4 , 0,15M NaCl pH 8,0,

Tampon B: 0,2M NaH_2PO_4 , 0,1M $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_5\text{COOOH}$, pH3

Tampon de neutralisation : Tris 2M pH 10,4

Protocole :

1) Laisser dégeler le sérum et y ajouter, sur glace, goutte à goutte une quantité équivalente (Vol/Vol) de solution saturée en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en agitant. Laisser 30 min sur table puis centrifuger 30 min à 4°C à 2500 rpm. Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 3 ml de PBS. Refaire 1x l'opération.

2) Dialyser contre du PBS pendant une nuit à 4°C.

3) Préparer une colonne protéine A-Sépharose en suivant les prescriptions du fournisseur.

4) Laver avec 20x le volume de la colonne de tampon A.

5) Placer l'échantillon de sérum dialysé sur la colonne, récolter le flow-trough.

6) Laver avec 10x le volume de la colonne de tampon A et éluer avec 3x le volume de la colonne de tampon B.

7) Collecter la fraction éluee dans des eppendorfs contenant 150 μl de tampon de neutralisation et mélanger par inversion, stocker à -20°C.

8) Ré-équilibrer la colonne avec 20x le volume de la colonne de tampon A et stocker la colonne contenant la résine à 4°C dans le tampon A contenant 0,02 % de thimérozal.

II.14 Dosage des Ac purifiés

Matériel : PBS : 100mM NaCl, 33mM NaH_2PO_4 , 17mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7,2

Protocole :

Mélanger 10 μl d'Ac élués avec 990 μl de PBS. Mesurer l'absorbance de la solution à 280nm en utilisant du PBS comme référence.

Calculer la quantité d'Ac purifiés en utilisant la formule suivante : $A_{280} \times \text{dilution (concentration)} / 1,38 = \text{concentration en mg/ml}$.

II.15 Amplification du produit de 90 pb avec les amorces SSARNi FOR et SSARNi REV

Matériel :

Miniprep du vecteur pBSK⁺-SuSyChic, dNTP (10 mM) (Roche), Tampon 10 x, amorces SSARNi REV (10 pm/ μl) et SSARNi FOR (10 pm/ μl), Taq polymérase (5u/ μl)(Roche), H_2O
Appareil PCR (Biozym)

Protocole : Préparer le mélange suivant : 41,5 μl H_2O , 5 μl Tampon 10x, 1 μl dNTP, 1 μl d'ADN (miniprep), 0,5 μl de SSARNi REV, 0,5 μl de SSARNiFOR et 0,5 μl de Taq polymérase. Placer ce mix dans l'appareil et le soumettre au programme suivant : 1 min à

94°C, 1 min à 94°C, 1 min à 55°C, 30 sec à 72°C (refaire 34 fois ces 3 dernières étapes), 10 min à 72°C et ∞ à 4°C. Stocker à -20°C.

II.16 Purification de cet insert en vue du clonage

Matériel :

Kit de purification Microcon (Millipore)

Protocole :

Placer 30µl d'ADN à purifier et 370µl d'eau désionisée sur la colonne et centrifuger 12 min à 8000 rpm à température ambiante. Inverser la colonne et la placer la colonne dans un nouveau tube. Ajouter 20µl d'eau et laisser sur table 5 min. Centrifuger ensuite 12 min à 4000 rpm à température ambiante.

Conserver le surnageant, qui contient l'ADN purifié, à -20°C jusqu'à utilisation.

II.17 Restriction du fragment RNAi SS par les enzymes AscI et SwaI

Matériel : Enzymes Asc I (10 u/µl) (NEB) SwaI (10u./µl) (NEB), BSA

Protocole : Restriction par AscI selon le mélange suivant : 9µl d'eau, 4µl de tampon NEB4 (10x), 25µl d'ADN template (produit PCR amplifié au départ du vecteur pCRII-SSARNi et purifié par le kit kit Microcon-Millipore, 2µl (=20unités) d'enzyme AscI.

Incubation pendant 2heures dans un bain thermostatisé à 37°C et inactivation pendant 20min dans un bain thermostatisé à 65°C.

Restriction par SwaI selon le mélange suivant : ajout de 22µl d'eau, 8µl de tampon NEB3 + BSA 100µg/ml, 2µl (= 20 unités) d'enzyme SwaI au 40 µl de produit de restriction AscI inactivé.

Incubation 2 heures dans un bain thermostatisé à 25°C

II.18 Ligation du fragment SSRNAi dans le vecteur pCRII

Déterminer la quantité d'insert purifié à ajouter au mélange par la formule suivante :

$X_{\mu g} \text{ de produit PCR} = (\text{nbre bp du produit PCR}) \cdot (50\text{ng du vecteur pCRII}) / (3900 \text{ bp de pCRII})$. Préparer le mélange de ligation suivant : 3,6 µl d'eau, 1µl de tampon de ligation (10x), 2,4µl de produit PCR dilué 10x en eau à partir du stock 15ng/µl, 2µl de vecteur pCRII (25ng/µl), 1µl de T4 DNA ligase (NEB)

Bien mélanger et placer les tubes une nuit à 14°C avant d'en prélever 2µl pour effectuer la transformation.

II.19 Mini-prep du plasmide pFGC5941

Matériel : bactéries *E. Coli* Dh5α contenant le plasmide pFGC5941

Milieu LB + Kanamycine 50µg/ml (cfr II.2).

Kit High Pure Plasmide Isolation Kit (Roche)

Protocole :

1) Mettre en culture les bactéries *E. Coli* Dh5α contenant le plasmide pFGC5941 (1 colonie pour 5 ml de milieu LB + Kanamycine 50 µg/ml (cfr II.2) et incuber une nuit à 37°C (250 rpm)

2) Centrifuger 4ml de suspension bactérienne et éliminer le surnageant.

3) Ajouter 250 µl de tampon de suspension + *RNase* sur le culot bactérien et resuspendre le culot sans vortexer pour ne pas cisailer le plasmide.

4) Ajouter 250 µl de tampon de lyse et mélanger doucement par inversion, 3 à 6 fois. Incuber max 5 min à température ambiante.

- 5) Ajouter 350 μ l de *Binding buffer* refroidi et mélanger doucement par inversion, 3 à 6 fois.
 - 6) Incuber sur glace pendant 5 min (la solution doit devenir trouble et un précipité doit se former). Centrifuger 10 min à vitesse maximale (13000 rpm)
 - 7) Après centrifugation, insérer un filtre High Pure™ dans des eppendorfs et transférer l'entièreté du surnageant dans le filtre. Centrifuger les eppendorfs avec les filtres à vitesse maximale pendant 30 à 60 sec.
 - 8) Enlever les filtres pour éliminer le liquide contenu dans les eppendorfs puis les replacer et les laver avec 700 μ l de *Wash Buffer II*.
 - 9) Centrifuger 30 à 60 sec à vitesse maximale et éliminer les filtrats. Centrifuger à nouveau 30 à 60 sec à vitesse maximale pour éliminer les éventuels restes de *Wash Buffer*.
 - 10) Placer les filtres sur de nouveaux eppendorf et déposer 100 μ l de tampon d'élution sur chacun d'eux. Centrifuger 30 à 60 sec à vitesse maximale.
- L'eppendorf contient ainsi l'ADN du plasmide. Celui-ci est stocké à -20°C.

II.20 Restrictions vérificatives du vecteur pFGC5941

Matériel : Asc I (10 u./ μ l) NEB, SmaI (10u./ μ l) NEB, BSA, XbaI (10u./ μ l) Gibco, BamHI(10u./ μ l) NEB

Protocole : Réaliser les restrictions selon les instructions dans le tableau suivant :

	AscI (NEB)	BamHI (NEB)	XbaI (Gibco)	SmaI (NEB)
H ₂ O	38 μ l	38 μ l	38 μ l	38 μ l
Tampon	5 μ l	10 μ l	5 μ l	10 μ l
ADN template	5 μ l	----	5 μ l	----
	----	+ mix de restriction par AscI	----	+ mix de restriction par XbaII
Enzyme (20 unités)	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
T° Activation (1 h)	37°C	25°C	37°C	37°C
Inactivation	20 min 65°C	----	10 min 65°C	----

II.21 Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose.

Matériel : Kit QIAEXII gel extraction Kit (Qiagen), Bain chauffant thermostatisé à 50°C.

Protocole : Ce protocole est valable pour l'extraction de fragments d'ADN de 40 bp à 50 kb, issus de gel standard de 0,3 à 2% en agarose.

- 1) Exciser la bande d'ADN du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel propre.
- 2) Peser le morceau de gel et ajouter 3 volumes de Tampon QX1 et 2 volumes d'eau par volume de gel dans le cas de l'extraction du vecteur pFGC5941 (11406bp) et 6 volumes de Tampon QX1 dans le cas de l'extraction du fragment RNAi (90bp).
- 3) Resuspendre la résine QIAEX II en vortexant 30 sec et ajouter 30 μ l de cette résine au gel immergé dans le tampon QX1. Incuber 10 min à 50°C en mélangeant toutes les 2 min pour maintenir la résine en suspension pour solubiliser l'agarose et fixer l'ADN sur la résine.
- 4) Centrifuger l'échantillon pendant 30 sec à vitesse maximale et enlever le surnageant, avec précaution, à l'aide d'une pipette.
- 5) Laver le culot avec 500 μ l de Tampon QX1 et resuspendre par inversion pour les grands fragments (Vortexer pour les petits fragments d'ADN). Centrifuger 30 sec et enlever le surnageant à la pipette.
- 6) Laver le culot une seconde fois avec 500 μ l de tampon PE. Resuspendre par inversion (pour le plasmide pFGC5941) ou en vortexant (pour le produit ARNi) et centrifuger 30 sec. Eliminer toute trace de surnageant à l'aide d'une pipette.
- 7) Laisser sécher le culot à l'air libre pendant 10 à 15 min jusqu'à ce qu'il soit devenu blanc.

- 8) Pour éluer l'ADN, ajouter 20µl de Tris-HCl 10mM, pH 8,5 et resuspendre le culot par inversion (pour le plasmide pFGC5941) ou en vortexant (pour le produit ARNi). Incuber pendant 5 min à température ambiante (produit ARNi) ou 10 min à 50°C (pFGC5941)
- 9) Centrifuger 30 sec et transférer avec précaution le surnageant contenant l'ADN purifié.

II.22 Précipitation phénol/chloroforme de l'ADN.

Matériel :

t-RNA (Gibco-BRL), phénol/chloroforme/alcool isoamulique (PCI) (Sigma) 25 :24 :1, éthanol 100% et 70%

Protocole :

- 1) Ajouter 1,5µl de t-RNA (10µg/ml) à l'ADN purifié sur colonne Microcon (cfr II.16)
- 2) Mélanger 1 volume de la solution avec 1 volume de PCI et vortexer. Centrifuger 5 min à vitesse maximale.
- 3) Récupérer la phase aqueuse et procéder à la précipitation de l'ADN en ajoutant 1/10 de volume de NaAc 3M pH6 et 2 volumes d'éthanol 100% froid.
- 4) Placer 20 min à -70°C.
- 5) Centrifuger 30 min à 13000 rpm à 4°C.
- 6) Enlever l'éthanol et laver le culot avec 500 µl d'éthanol 70% froid.
- 7) Centrifuger 30 min à 13000 rpm à 4°C.
- 8) Reprendre le culot dans 10 µl d'eau désionisée et placer à 37°C pendant 1 heure en vortexant 30 sec de temps en temps pour bien resuspendre l'ADN.

II.23 Ligation du fragment RNAi dans le vecteur pFGC5941 par le « Quick Ligation Kit » (NEB)

Préparer les mélanges de ligation suivants :

Vecteur (15ng/µl)	3,3µl	3,3µl	3,3µl
Insert	2 µl	4 µl	Contrôle sans insert
Eau	4,7 µl	2,7 µl	6,7 µl
Tampon 2x Quick Ligation	10 µl	10 µl	10 µl
Quick T4 DNA ligase	1 µl	1µl	1 µl

Bien mélanger et placer les tubes 30 min à 25°C avant de prélever 2 µl pour effectuer la première transformation. Placer le mélange de ligation restant, une nuit à 16°C et procéder à une seconde transformation.

II.24 Transformation de bactéries TOP 10F' par choc thermique

Matériel :

One shot transformation kit, Invitrogen,
Milieu SOC, Bain thermostatisé à 42°C, Etuve à 37°C

Protocole :

- 1) Placer sur glace les bactéries compétentes conservées à -80°C.
- 2) Lorsque les bactéries sont décongelées, ajouter 2µl de produits de ligation. Mélanger délicatement avec le tips et incuber les bactéries 30 min sur glace.
- 3) Réaliser le choc thermique en plaçant les bactéries exactement 30 secondes dans le bain à 42°C.
- 4) Incuber les bactéries 2 min sur glace.
- 5) Ajouter 250 µl de milieu SOC (préalablement incubé à 37°C) et incuber les bactéries à 37°C sous agitation (225rpm) pendant une heure.
- 6) Etaler 50 et 200µl de bactéries sur le milieu sélectif adéquat.

RESULTATS

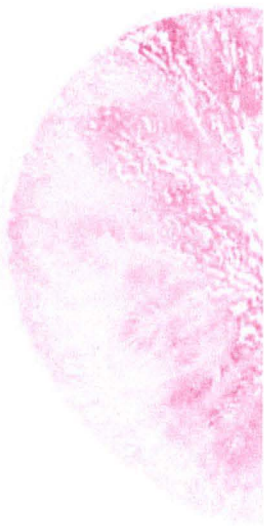


Figure 20 : Vérification de l'efficacité du transfert de protéines de racine de chicorée sur une membrane PVDF par coloration par le rouge Ponceau



Figure 21 : Vérification de la présence de peroxydases endogènes dans la racine de chicorée par incubation du « tissue print » dans le substrat TMB

III. RESULTATS

L'objectif de ce travail est de contribuer à la compréhension du rôle de la sucrose synthase dans la racine de chicorée et plus particulièrement à fournir des éléments de réponse permettant d'impliquer ou non cette enzyme dans le métabolisme des fructanes.

Pour ce faire, nous avons entrepris, d'une part, de mettre en évidence la localisation tissulaire de la SuSy dans la racine de chicorée, et d'autre part, de réaliser une construction ARNi permettant d'abolir l'expression de la sucrose synthase dans la racine de chicorée.

Dans une première partie, nous présentons les résultats obtenus en matière d'immunolocalisation de la SuSy dans la racine de chicorée. La seconde partie sera consacrée à la présentation des manipulations de biologie moléculaire effectuées dans le cadre de la construction ARNi ciblant une SuSy de racine de chicorée.

I. Immunolocalisation de SuSy dans la racine de chicorée.

I.1 Tissue-print de la sucrose synthase.

Nous savions en débutant ce travail que le polysérum anti-SuSy (1,34mg/ml) généré au laboratoire par immunisation d'un lapin avec une SuSy d'*A. thaliana* (SUS1) exprimée en bactérie, était capable de reconnaître les protéines homologues de chicorée en Western blot. Nous n'avions par contre aucune idée du fonctionnement de ce polysérum pour la localisation de la sucrose synthase *in situ*.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord envisagé la technique de « tissue-printing » (Cassab et Varner, 1987) qui consiste à réaliser des empreintes de tranches de tissus frais sur une membrane (nitrocellulose ou PVDF), puis de marquer ces « tissue-prints » avec des anticorps de manière à visualiser les protéines cibles dans les tissus. L'avantage de cette approche est de permettre l'immobilisation de l'antigène cible sous sa conformation native, là où il est présent *in situ*.

Nous avons donc entrepris d'appliquer cette technique à la racine de chicorée. Pour ce faire, des racines de chicorée prélevées en champ en automne et maintenues en chambre froide (4°C) et à l'obscurité, ont été coupées en tranches et ces dernières ont été pressées sur une membrane de PVDF pendant une minute. Après un séchage de 5 minutes à température ambiante, la qualité du transfert des protéines a été vérifiée par coloration des membranes avec du rouge Ponceau (figure 20).

Si, dans le cas des « tissue-prints », la protéine cible est transférée sous sa forme native, il en est de même pour les autres protéines contenues dans les tissus, et plus particulièrement des peroxydases, dont les tissus végétaux sont souvent très riches. Nous avons vérifié la richesse en peroxydases de la racine de chicorée en plaçant directement une empreinte de tranche de racine dans du TMB, un substrat permettant de révéler l'activité des peroxydases. Comme le montre la figure 21, une forte coloration du « tissue-print » a immédiatement suivi, indiquant par là une forte présence de peroxydases endogènes dans la racine de chicorée. Nous avons donc décidé de travailler avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline, en utilisant le substrat NBT-BCIP pour révéler l'activité de cette dernière. La détection de la sucrose synthase par Western blots, réalisée dans le cadre du mémoire d'A. Daems (2002), a été effectuée en utilisant un tampon TBS contenant 137 mM

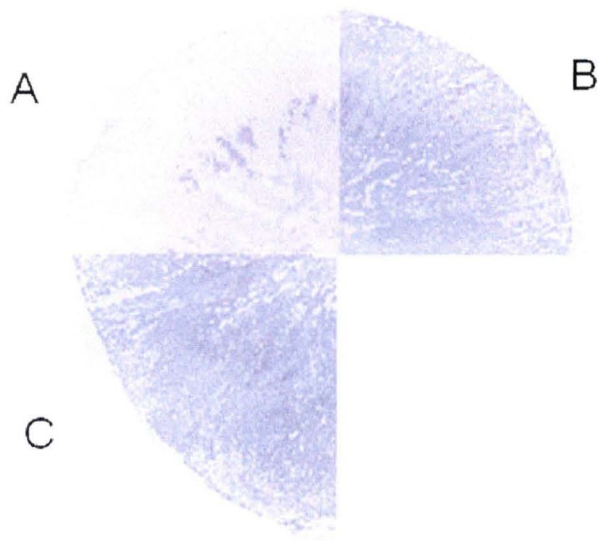


Figure 22 : Immunolocalisation de la sucrose synthase dans la racine de chicorée. Marquage de « tissu prints » avec un polysérum de lapin anti-SuSy et révélation avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (tampon TBS contenant 137 mM en NaCl).

- A : Contrôle sans Ac anti-SuSy, Ac secondaires dilués 10.000 x
 B : Ac anti-SuSy dilués 10.000 x, Ac secondaires dilués 10.000 x
 C : Ac anti-SuSy dilués 5.000 x, Ac secondaires dilués 10.000 x

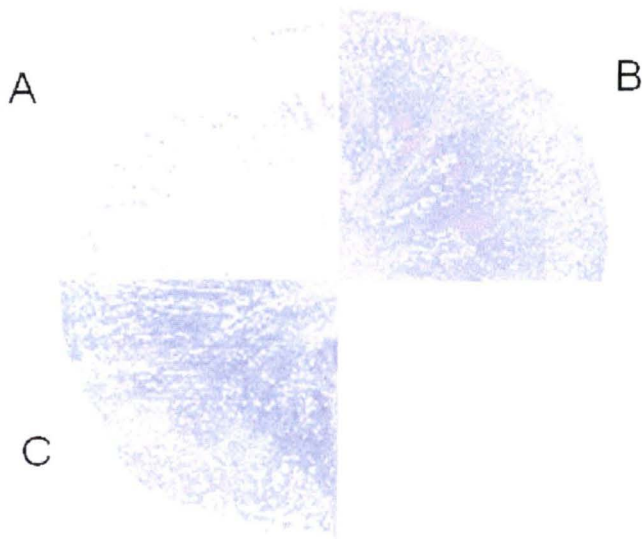


Figure 23 : Immunolocalisation de la sucrose synthase dans la racine de chicorée. Marquage de « tissu prints » avec un polysérum de lapin anti-SuSy et révélation avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (tampon TBS contenant 137 mM en NaCl).

- A : Contrôle sans Ac anti-SuSy, Ac secondaires dilués 5.000 x
 B : Ac anti-SuSy dilués 10.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x
 C : Ac anti-SuSy dilués 5.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

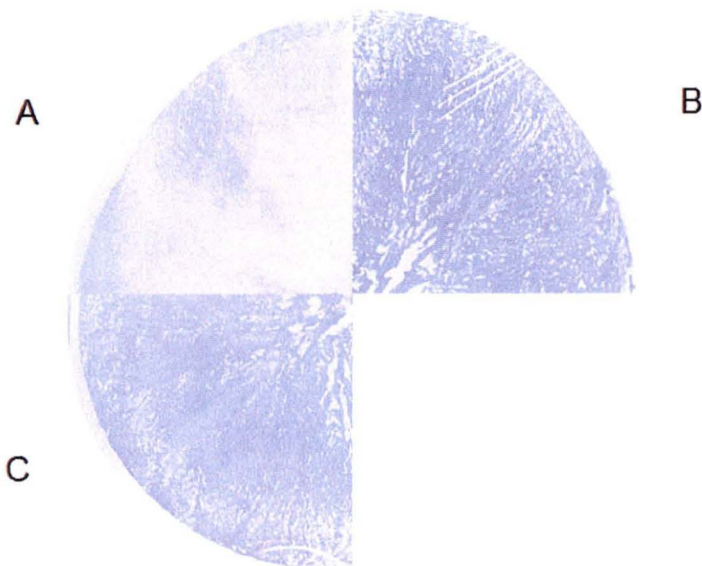


Figure 24: Immunolocalisation de la sucrose synthase dans la racine de chicorée. Marquage de « tissue prints » avec un polysérum de lapin anti-SuSy et révélation avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (tampon TBS contenant 137 mM en NaCl).

A : Contrôle sans Ac anti-SuSy, Ac secondaires dilués 5.000 x

B : Ac anti-SuSy dilués 5.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

C : Ac anti-SuSy dilués 10.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

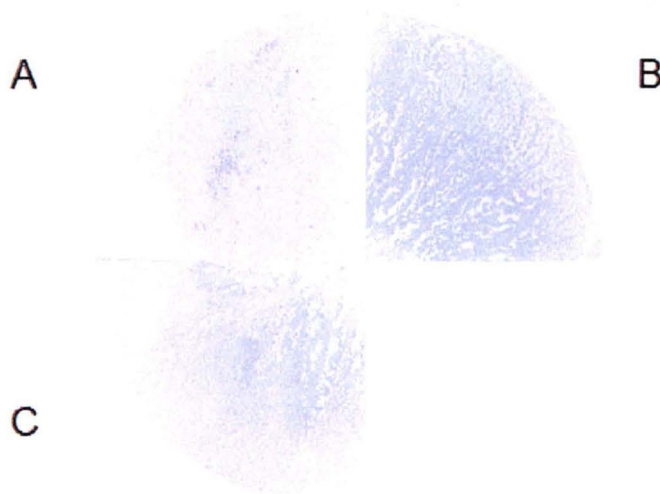


Figure 25 : Immunolocalisation de la sucrose synthase dans la racine de chicorée. Marquage de « tissue prints » avec un polysérum de lapin anti-SuSy et révélation avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (tampon TBS contenant 500 mM en NaCl).

A : Contrôle sans Ac anti-SuSy, Ac secondaires dilués 5.000 x

B : Ac anti-SuSy dilués 5.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

C : Ac anti-SuSy dilués 10.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

en NaCl. Nous avons donc utilisé ce même tampon pour localiser la SuSy *in situ* tant dans les expériences de « tissue-print » que pour la détection en immunofluorescence sur coupes.

Nous avons ensuite déterminé les conditions optimales de marquage des « tissue-prints » en jouant essentiellement sur deux paramètres : la dilution des anticorps primaires et secondaires.

Des « tissue-prints » ont donc été marqués en utilisant différentes combinaisons de dilution des anticorps primaires anti-SuSy (1,34 mg/ml) et secondaires. Ainsi, les anticorps secondaires ont été testés à deux dilutions : la dilution 10.000 x (Figure 22) et la dilution 5.000 x (Figure 23). Dans les deux cas, les anticorps primaires ont été utilisés aux dilutions 10.000 x et 5.000 x. Les morceaux A de chacune des figures correspondent aux contrôles sans anticorps anti-SuSy. Les marquages obtenus pour une dilution 5.000 x des anticorps secondaires (Figure 23) étaient généralement plus nets et avec un contrôle plus propre que pour une dilution 10.000 x. Nous avons, sur base de ces résultats, décidé de poursuivre les marquages avec les anticorps anti-SuSy utilisés à une dilution de 5.000 x (Figure 23 C), ce qui donne un signal plus intense qu'à la dilution 10.000 x (Figure 23 B) et avec les anticorps secondaires également dilués 5.000 x.

I.1.1 Vérification de la spécificité du marquage

Nous avons ensuite entrepris de vérifier l'intensité et donc la spécificité de la liaison de l'anticorps primaire à son antigène. Pour cela, nous avons pris en compte deux paramètres. Le premier est la molarité en NaCl du tampon TBS utilisé dans les étapes d'incubations et de lavages du processus de marquage. Nous sommes passés d'un tampon contenant 137 mM (Figure 24) en NaCl à un tampon en contenant 500 mM (Figure 25). Cette augmentation de la molarité en NaCl devait permettre de vérifier la spécificité de la liaison des anticorps primaires à la sucrose synthase en interférant avec la fixation de faible intensité des anticorps et de vérifier le bruit de fond dû aux anticorps secondaires. Pour le marquage réalisé en utilisant le tampon TBS contenant 137 mM de NaCl, nous observons un bruit de fond assez important sur le quart du « tissue-print » qui correspond au contrôle sans anticorps primaires (Figure 24 A), le quart B a, lui, été incubé dans l'anticorps primaire et ensuite dans l'anticorps secondaire, tous deux dilués 5.000 x. Le signal est relativement net par rapport au signal produit par l'incubation du quart C dans l'anticorps primaire dilué 10.000 x et dans l'anticorps secondaire dilué 5.000 x. Quant au marquage effectué avec le tampon contenant 500 mM en NaCl, le contrôle sans anticorps primaire (Figure 25 A) est très bon, pour des dilutions de l'anticorps secondaires de 5.000 x, le marquage par l'anticorps primaire utilisé à une dilution 5.000 x est important par rapport au contrôle tandis que pour une dilution 10.000 x de l'anticorps primaire (Figure 25 C), le signal est assez faible.

Nous pouvons observer sur ces figures que le « tissue-print » réalisé en présence de TBS contenant 500 mM présente un marquage de plus faible intensité par rapport à la condition 137 mM, essentiellement dans le contrôle négatif, tout en restant net et significatif, principalement dans le cas d'une dilution 5.000 x en anticorps primaires (Figure 25 B). Ces résultats indiquaient donc que même en conditions de concentration élevée en sels, la liaison anticorps-antigène avait lieu. Le marquage obtenu, bien que légèrement plus faible que celui réalisé avec le tampon TBS contenant 137 mM en NaCl, était plus spécifique et donc plus représentatif. Nous avons décidé de poursuivre les marquages en utilisant ces conditions de molarité plus élevée en NaCl.

Le second contrôle permettant de vérifier la spécificité du marquage observé *in situ* consiste à procéder à une pré-incubation de l'anticorps primaire anti-SuSy avec son antigène



Figure 26: Purification de la sucrose synthase recombinante exprimée en bactéries *E.Coli* BL21DE3 par chromatographie d'affinité. Analyse sur gel SDS-Page 8% après coloration au bleu de Coomassie de 10 μ l des différents éluats ainsi obtenus.
PM : Etalon de poids moléculaires

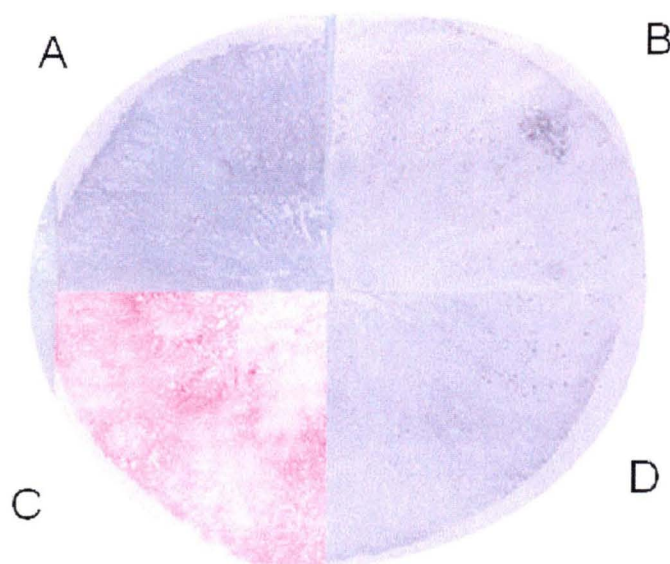


Figure 27: Immunolocalisation de la sucrose synthase dans la racine de chicorée. Marquage de « tissue prints » avec un polysérum de lapin anti-SuSy et révélation avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (tampon TBS contenant 500 mM en NaCl).

A : Ac anti-SuSy dilués 5.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

B : Ac anti-SuSy dilués 5.000 x + 20 μ l de SuSy purifiée (Ech.2) (soit 86 ng de protéines), Ac secondaires dilués 5.000 x

C : Rouge Ponceau pour contrôler le transfert des protéines sur la membrane PVDF.

D : Contrôle sans Ac anti-SuSy, Ac secondaires dilués 5.000 x

cible, la sucrose synthase. En effet, si l'anticorps de lapin est bien spécifique de la SuSy, l'incubation de cette protéine avec l'anticorps permet à ce dernier de se lier à la sucrose synthase, ce qui doit inhiber la reconnaissance de toute structure par l'anticorps lors de l'incubation avec le « tissu-print ». Cela prouverait alors que, sur les « tissu-prints » marqués par l'anticorps n'ayant pas été préalablement mis en contact avec son antigène, le marquage obtenu est bien dû à la reconnaissance de la SuSy par les anticorps primaires.

I.1.2 Production et purification de sucrose synthase recombinante

Pour réaliser ce contrôle, nous avons produit et purifié un stock de sucrose synthase recombinante. Ainsi, nous avons mis en culture des bactéries BL21DE3 contenant le vecteur d'expression recombinant pET17b-SS codant pour une sucrose synthase d'*A. thaliana*. Cette construction a été générée au laboratoire dans le cadre d'un projet de recherche. Les protéines exprimées par les bactéries BL21DE3 transformées avec ces vecteurs sont en fait des protéines de fusion qui possèdent un T7-tag à leur extrémité N-terminale. Afin de contrôler l'efficacité de la production des protéines par ces bactéries, nous avons préparé des cultures liquides de milieu sélectif,ensemencées avec des colonies de bactéries contenant le vecteur pET17b-SS. La production de la protéine recombinante est induite par l'ajout d'IPTG. Des cultures non induites ont été utilisées comme contrôle. Trois heures après avoir ajouté l'IPTG à la culture, les bactéries ont été récoltées par centrifugation puis lysées par sonication.

Une analyse sur gel SDS-PAGE des extraits protéiques ainsi obtenus à partir de ces cultures a permis de vérifier l'efficacité de la production de la protéine recombinante par les bactéries. Le chargement de ces extraits protéiques sur un gel SDS-PAGE 8% (non montré) nous a permis de vérifier que la protéine était effectivement produite en quantité importante par les bactéries transformées avec les vecteurs appropriés. Le poids moléculaire de la protéine d'intérêt est de 90 kDa.

Des cultures de plus grand volume ont ensuite été effectuées de manière à purifier la SuSy recombinante par chromatographie d'affinité.

La protéine SuSy recombinante étant fusionnée avec un T7-tag, nous avons utilisé une résine de chromatographie sur laquelle sont fixés des anticorps anti-T7 tag, résine fournie dans le kit « T7 tag purification » de Novagen. La figure 26 présente l'analyse sur gel SDS-PAGE de la protéine SuSy recombinante purifiée et met en évidence l'efficacité de la technique. En effet, on peut observer sur le gel que les bandes correspondant aux protéines purifiées se trouvent un peu au dessus de la bande de l'étalon correspondant à un PM de 75 kDa, ce qui coïncide avec le poids moléculaire attendu pour la sucrose synthase, qui est de 90 kDa.

Les protéines ainsi purifiées ont ensuite été quantifiées par la méthode « NanoOrange ».

Nous avons pré-incubé les anticorps anti-SuSy avec différentes quantités de protéine SuSy, nous avons ensuite centrifugé les tubes avant de procéder au marquage des « tissu-print » avec le surnageant. Nous avons ainsi pu déterminer que 20 µl d'un échantillon de protéines recombinantes (4,3 mg/ml) étaient nécessaires pour saturer totalement l'anticorps primaire dilué 5.000 x. La figure 27 fait apparaître clairement que le signal obtenu pour l'anticorps dilué 5.000 x préalablement incubé avec 20 µl de la protéine SuSy (Figure 27 B) était d'une part, nettement plus faible que le signal obtenu avec l'anticorps primaire dilué 5.000 x et utilisé à l'état brut (Figure 27 A) et d'autre part, très proche du signal obtenu pour

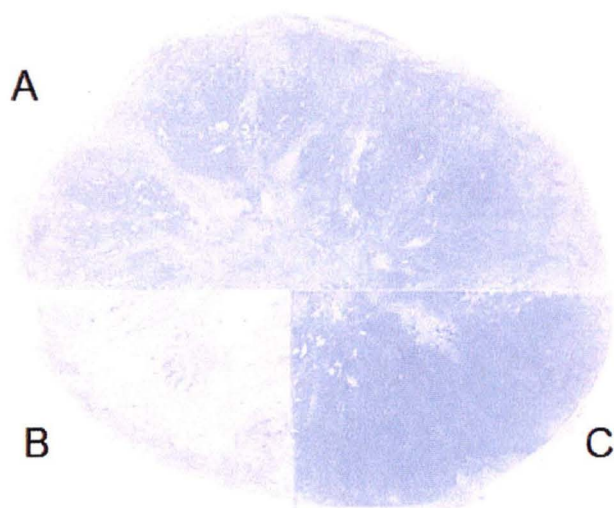


Figure 28: Immunolocalisation de la sucrose synthase dans la racine de chicorée, après incubation de la membrane dans les fixateurs suivants : paraformaldéhyde 4% et glutaraldéhyde 0,2%. Marquage de « tissue prints » avec un polysérum de lapin anti-SuSy et révélation avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (tampon TBS contenant 500 mM de NaCl).

A : Membrane fixée, Ac anti-SuSy dilués 5.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

B : Contrôle sans Ac anti-SuSy, Ac secondaires dilués 5.000 x

C : Membrane non fixée, Ac anti-SuSy dilués 5.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

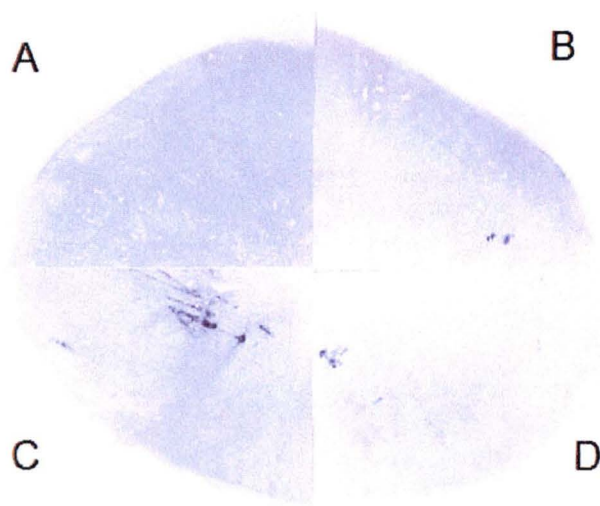


Figure 29: Immunolocalisation de la sucrose synthase dans la racine de chicorée, après incubation de la membrane dans les fixateurs suivants : paraformaldéhyde 4% avec ou sans Triton X100 0,1%. Marquage de « tissue prints » avec un polysérum de lapin anti-SuSy et révélation avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (tampon TBS contenant 500 mM de NaCl).

A : Membrane non fixée, Ac anti-SuSy dilués 5.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

B : Membrane fixée, Ac anti-SuSy dilués 5.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

C : Membrane fixée sans Triton X100, Ac anti-SuSy dilués 5.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

D : Membrane fixée contrôle, Ac anti-SuSy dilués 5.000 x, Ac secondaires dilués 5.000 x

le contrôle sans anticorps primaire (Figure 27 C). L'anticorps secondaire était dilué 5.000 x dans les trois cas. Ces résultats confirmaient donc la spécificité du marquage des « tissue-prints », le signal observé sur toute la surface de la racine était bien le résultat de la reconnaissance de la sucrose synthase par l'anticorps anti-SuSy.

I.1.3 Fixation des « tissue-prints »

Dans la perspective de reproduire ce type de marquage sur des coupes de tissus de racine de chicorée, une ultime vérification restait à faire : tester l'efficacité du marquage après une incubation des empreintes dans les mélanges fixateurs. La fixation consiste à figer les cellules dans un état proche du vivant de façon à permettre la conservation des tissus à plus long terme. Cependant, l'antigénicité des protéines cibles peut être altérée par cette étape de fixation. Or il était important de savoir si le polysérum anti-SuSy était toujours capable de détecter la présence de SuSy dans les tissus fixés.

Nous avons donc testé deux protocoles de fixation, fournis dans la littérature et utilisés dans le cadre de la détection immunologique de SuSy. Le premier était composé de 4% de paraformaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate 0,1M à pH 6,8 et contenant 0,05 M de sucrose (Brangeon *et al.*, 1996). Le second comprenait 4% de paraformaldéhyde et 0,1% de Triton X100 dans le même tampon phosphate (Wächter *et al.*, 2003). Des « tissue-prints » de racine de chicorée ont été traités avec ces solutions de fixation pendant 4 heures à 4°C (Brangeon *et al.*, 1996) ou à 25°C (Wächter *et al.*, 2003). Dans chacun des cas, un morceau de « tissue-print » a été incubé dans le tampon sans fixateur et a ainsi été utilisé comme contrôle. Après quatre lavages dans le tampon phosphate contenant 0,05 M en sucrose, les « tissue-prints » ont été marqués comme décrit précédemment. En comparaison avec le marquage de l'empreinte non fixée (Figure 28 C), l'intensité du marquage de l'empreinte fixée selon Brangeon et ses collaborateurs (1996) est plus faible mais reste nettement plus importante que le « bruit de fond » observé sur l'empreinte incubée avec les anticorps secondaires seuls (Figure 28 D).

Nous avons ensuite testé le protocole de fixation proposé par Wächter et ses collaborateurs (2003). La fixation a été effectuée pendant 4 heures à une température de 25°C dans ce tampon pour les morceaux B et D de la figure 29 qui présentent un marquage plus faible que la section C de cette même figure qui, elle, a été mise à incuber dans une solution ne contenant pas de Triton X100. Le dernier morceau du « tissue-print » n'a quant à lui pas été en contact avec des substances fixatrices avant le marquage. Le signal de ce morceau contrôle A est proche de celui obtenu pour le morceau fixé uniquement avec la paraformaldéhyde. Le marquage est généralement plus faible que pour le mélange de fixation précédemment utilisé.

I.1.4 « Tissue-prints » : Conclusion.

En conclusion, les anticorps primaires anti-SuSy permettent une localisation nette de la protéine en « tissue-prints », la spécificité de cette localisation étant confirmée d'une part par la restriction imposée par la molarité du tampon TBS, et d'autre part, par l'abolition du marquage dû à la pré-incubation de l'anticorps primaire avec la protéine sucrose synthase purifiée. De plus, la fixation préalable des antigènes sur le support dans les conditions de Brangeon et ses collaborateurs (1996) permet de maintenir un bon niveau de reconnaissance de la protéine par l'anticorps. Nous avons donc retenu le protocole de fixation avec 4% de

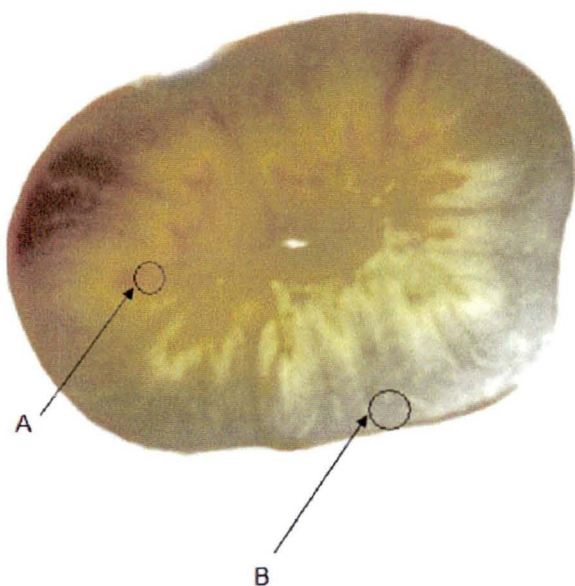
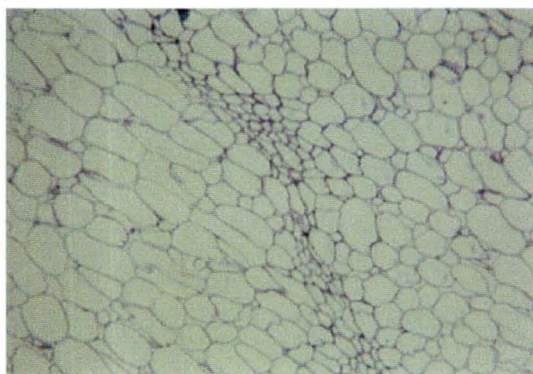
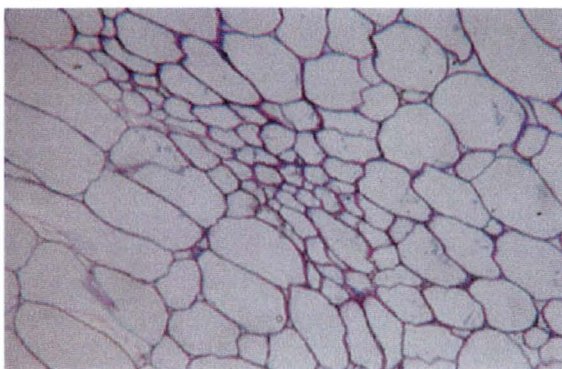


Figure 30: Coupe transversale de racine de chicorée. Les flèches indiquent les zones dans lesquelles ont été découpé les morceau de tissus soumis à la fixation, en vue de préparer les coupes histologiques. Tant la zone des faisceaux (A) que la périphérie de la racine (B) ont été analysées sur coupe.

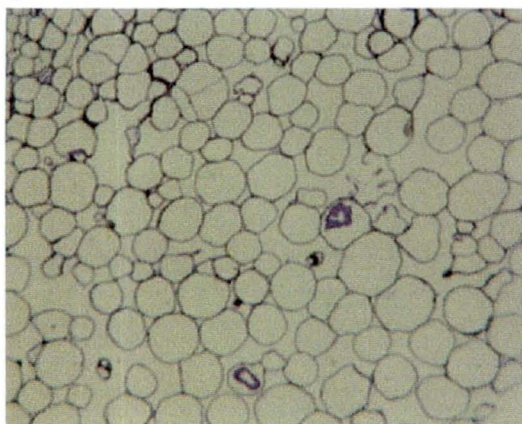
A



B



C



D

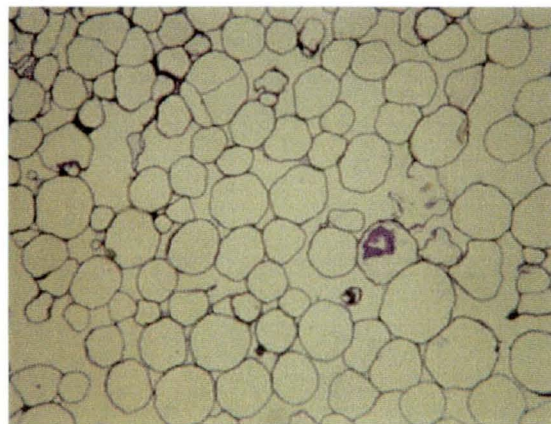
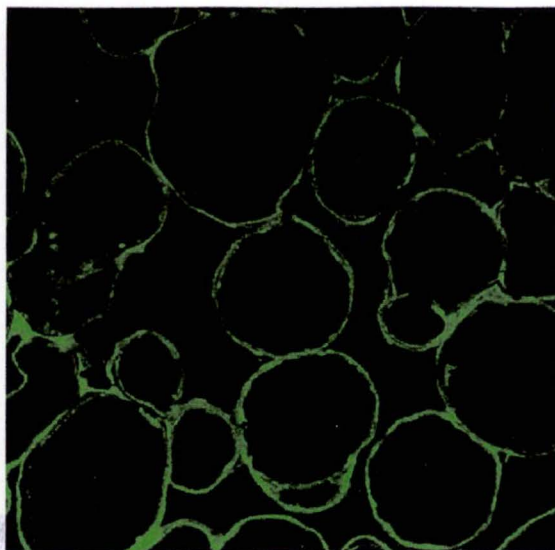


Figure 31 : Photographies des coupes histologiques de faisceaux (A et B) et de parenchyme (C et D) de racines de chicorée. Ces coupes ont été colorées au bleu de toluidine. Grossissement 10 x (A et C), grossissement 20 x (B et D).

A



B

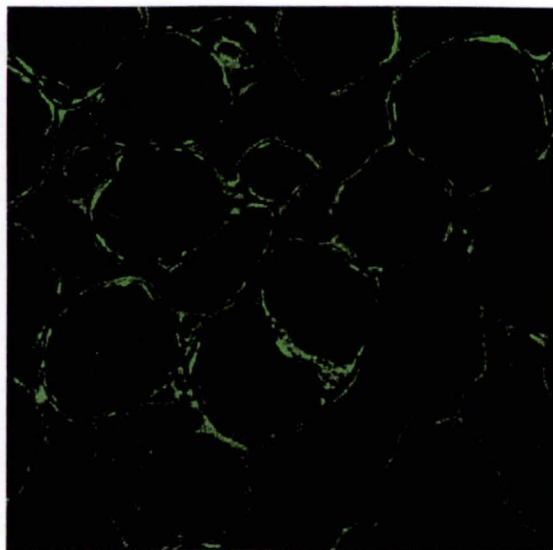


Figure 32 : Photos, obtenues au microscope confocal (immunofluorescence), de cellules du parenchyme de la racine de chicorée marquées avec un anticorps anti-SuSy dilué 500 x (A) et 1.000 x (B) et avec des anticorps secondaires couplés au fluorochrome alexa 488 dilués 200x. Grossissement 40 x.

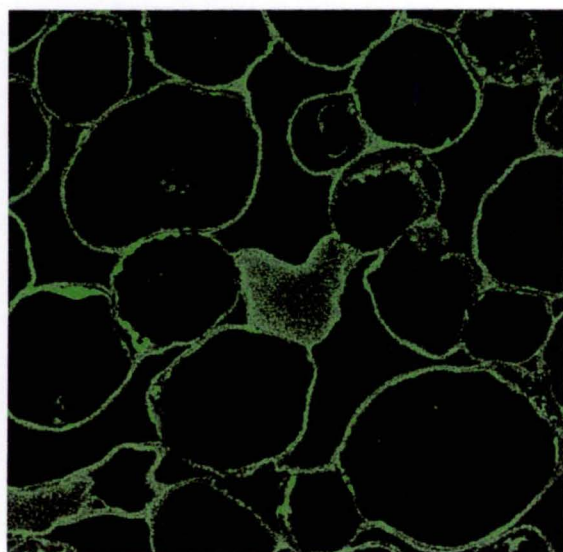


Figure 33 : Mise en évidence au microscope confocal de l'autofluorescence d'un tissu parenchymateux de racine de chicorée. Grossissement 40 x.

paraformaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 6,8 et contenant 0,05 M de sucrose pendant quatre heures à 4°C pour entreprendre une immunolocalisation de la sucrose synthase sur coupes ultrafines.

I.2 Localisation de SuSy par la immunofluorescence.

Notre objectif était de localiser la sucrose synthase de façon plus précise qu'avec les tissue-prints. En effet, ceux-ci nous ont permis d'observer la présence de sucrose synthase dans la racine mais ne fournissaient aucune précision quant à la localisation cellulaire de la protéine. La réalisation de coupes semi-fines devait nous permettre, grâce à la microscopie en fluorescence, de combler ce manque.

Nous avons sélectionné les échantillons à fixer au niveau des faisceaux conducteurs et en périphérie de la racine, comme nous le montrons sur la figure 30. Des coupes non marquées, colorées au bleu de toluidine ont été photographiées (Figure 31). Les tissus fixés ont ensuite été déshydratés, grâce à des concentrations croissantes en éthanol puis enrobés dans une résine hydrophile LR White.

Après avoir enrobé les différents fragments de racine, ceux-ci ont été découpés en coupes semi-fines par Chantal Devignon de l'Unité Interfacultaire de Microscopie Electronique et montés sur lames. Nous avons ensuite marqué ces coupes avec l'anticorps primaire spécifique de SuSy utilisé à différentes dilutions. L'anticorps secondaire était cette fois couplé à un fluorochrome (Alexa 488 nm). Les observations ont été faites au moyen d'un microscope confocal, grâce à la collaboration de Catherine Demazy, de l'unité de biologie cellulaire animale.

I.2.1 Marquage de coupes semi-fines de racines de chicorée

Après avoir incubé les coupes dans l'agent bloquant (poudre de lait), celles-ci ont été marquées, selon une procédure similaire au marquage des « tissue-prints », par l'anticorps primaire anti-sucrose synthase et ensuite par un anticorps secondaire couplé cette fois à un fluorochrome de type « Alexa 488 », ceci pour permettre l'observation de ces coupes au microscope confocal. Comme pour les « tissue-prints », des mises au point des dilutions des anticorps ont été réalisées. Aucune des combinaisons de dilutions anticorps primaires et anticorps secondaires testées n'a permis la localisation de la sucrose synthase au niveau des cellules, et ce malgré les différentes modifications du protocole expérimental. Nous présentons à la figure 32 deux clichés obtenus pour des coupes marquées avec l'anticorps anti-SuSy dilué 500 x (A) et 1.000 x (B). L'anticorps secondaires couplé à Alexa 488 nm était quant à lui dilué 200 x. La figure 33 met en évidence l'importante autofluorescence des tissus végétaux.

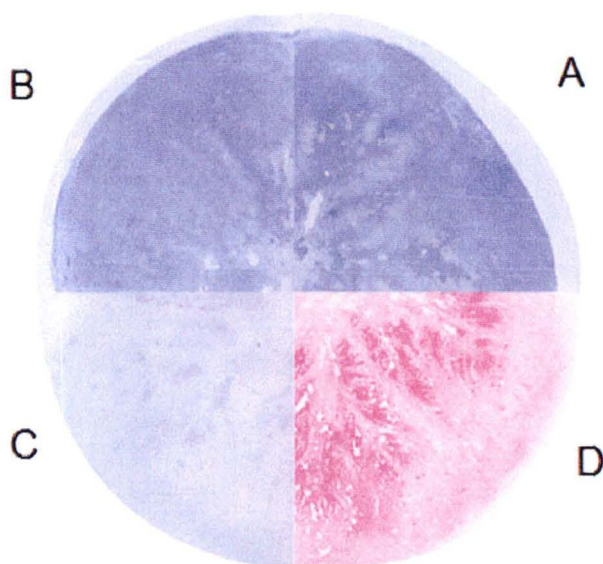


Figure 34 : Immunolocalisation de l'UDP-glucose-déshydrogénase dans la racine de chicorée. Marquage de « tissue-prints » avec un polysérum de lapin anti- UDP-glucose-déshydrogénase recombinante non purifié et révélation avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dilué 5.000 x.

A : Ac anti-UDP-glucose-déshydrogénase dilués 5.000 x

B : Ac anti-UDP-glucose-déshydrogénase dilués 5.000 x pré-incubé avec 10 µl de protéine bovine

C : Contrôle sans Ac anti- UDP-glucose-déshydrogénase

D : Rouge Ponceau pour contrôler le transfert des protéines sur la membrane PVDF.

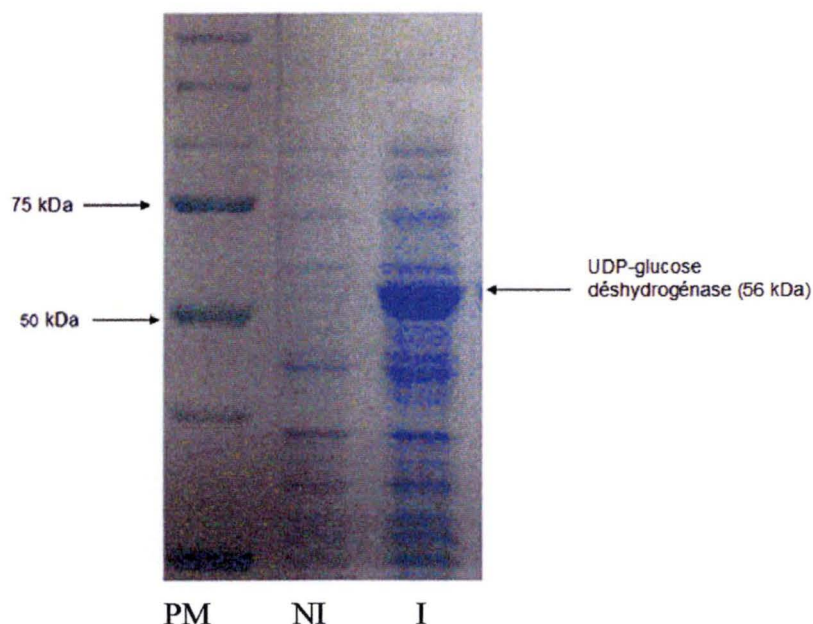


Figure 35 : Induction de l'expression de l'UDP-glucose-déshydrogénase en *E.coli*. Analyse en gel SDS-PAGE 8%, après coloration au bleu de coomassie, des protéines totales extraites au départ de bactéries BL21DE3 contenant le vecteur pET17b-G-IDh cultivées en présence (I) ou en absence (NI) d'IPTG durant 3 heures.

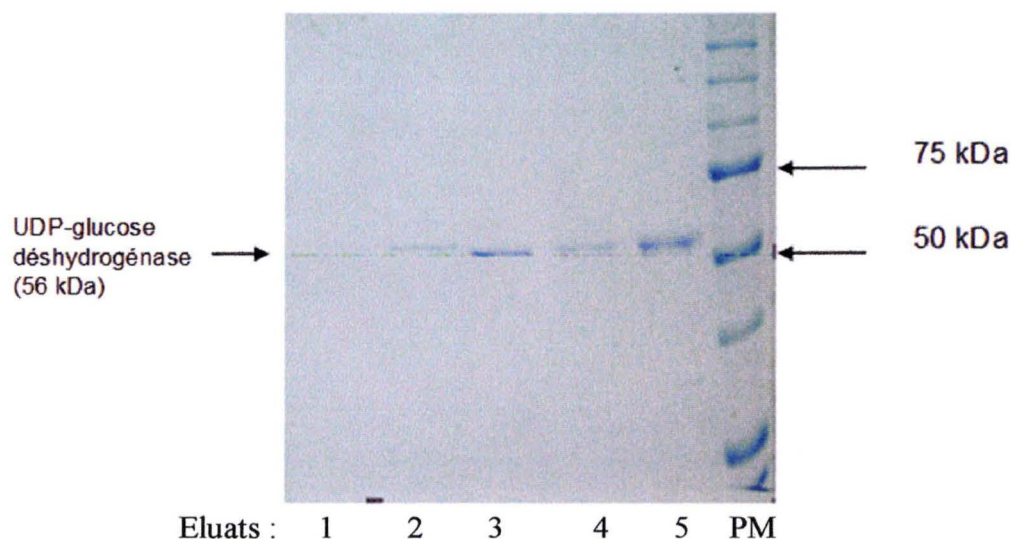


Figure 36 : Purification des UDP-glucose-déshydrogénases recombinantes, par chromatographie d'affinité T7-Tag. Analyse sur gel SDS-PAGE 8% après coloration au bleu de Coomassie des cinq éluats récoltés. Chargement de 10 μ l de chaque éluat/puits.
PM : Etalon de poids moléculaire (Bio-Rad : 161-0373)

II. Localisation de l'UDP-glucose déshydrogénase (UDPGDH)

Suite à différents travaux réalisés au laboratoire, une forte activité de type UDP-glucose déshydrogénase a été observée dans la racine de chicorée. La présence importante de cette enzyme a été confirmée par immunomarquages d'extraits protéiques de racines de chicorée analysées en Western blot (Liners *et al.*, 2003). Sur base de ces informations, nous avons décidé d'étendre notre objectif de localisation *in situ*, dans la racine de chicorée, à cette enzyme impliquée dans la synthèse de composés pariétaux.

Nous avons donc utilisé la même technique que pour localiser la sucrose synthase : le marquage de « tissue-prints ». L'anticorps primaire employé dans ce cas était un sérum de lapin dirigé contre une UDPGDH d'*Arabidopsis* produite sous forme recombinante, disponible au laboratoire. Celui-ci a été utilisé à une dilution 5.000 x, de même que l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline.

Les résultats présentés à la figure 34 montrent un fort marquage de toute la surface de la racine de chicorée avec le polysérum. Le faible bruit de fond observé sur l'empreinte de racine incubée avec l'anticorps secondaire seul atteste de la spécificité du marquage observé en présence du polysérum. Comme dans le cas de la SuSy, la spécificité du marquage obtenu à l'aide du polysérum a été vérifiée par pré-incubation de ce dernier tout d'abord avec de l'UDP-glucose déshydrogénase bovine, qui partage une forte homologie (plus de 80%) avec l'UDP-glucose déshydrogénase végétale. Cette pré-incubation n'a pas conduit à une diminution significative du marquage dû au polysérum (Figure 34B). Ces résultats signifiaient donc que la protéine bovine n'avait pas saturé tous les sites de reconnaissance sur l'anticorps primaire. Nous avons donc entrepris d'exprimer et de purifier de l'UDP-glucose déshydrogénase recombinante en suivant la même procédure que celle décrite précédemment, dans le cadre de la purification de la sucrose synthase recombinante produite en bactéries. Le chargement sur gel SDS-PAGE 8% des extraits protéiques bruts de bactéries induites par l'IPTG pour la production d'UDP-glucose déshydrogénase recombinante est présenté à la figure 35. La figure 36, quant à elle, met en évidence l'efficacité de la purification des protéines UDP-glucose déshydrogénase par chromatographie d'affinité. En effet, nous pouvons observer sur cette figure la présence dans le gel SDS-PAGE d'une protéine à un PM légèrement supérieur à 50 kDa qui correspond à de l'UDP-glucose déshydrogénase (56 kDa). Suite à cette purification, un nouveau marquage a été réalisé en faisant incuber préalablement l'anticorps primaire avec la protéine purifiée, sans pour cela obtenir une diminution significative de l'intensité du marquage.

L'anticorps primaire utilisé dans ce cas était un sérum utilisé à l'état brut, il semblait dès lors intéressant de procéder à une purification de ce sérum sur colonne protéine A sepharose. Cette opération, dans le cas du sérum anti-SuSy, nous ayant permis d'obtenir des marquages très spécifiques.

II.1 Purification des anticorps anti-UDP-glucose déshydrogénase.

Pour mener à bien cette purification, nous avons tout d'abord précipité les immunoglobulines du sérum avec une solution saturée en sulfate d'ammonium. Cette solution enrichie en immunoglobulines a ensuite été dialysée avant d'être déposée sur une colonne de protéines A sepharose de manière à purifier spécifiquement la fraction IgG du polysérum. Ces IgG ont ensuite été quantifiés par une mesure de DO à 280 nm. Nous avons utilisé, pour poursuivre les marquages, un échantillon de concentration 2,6 mg/ml.

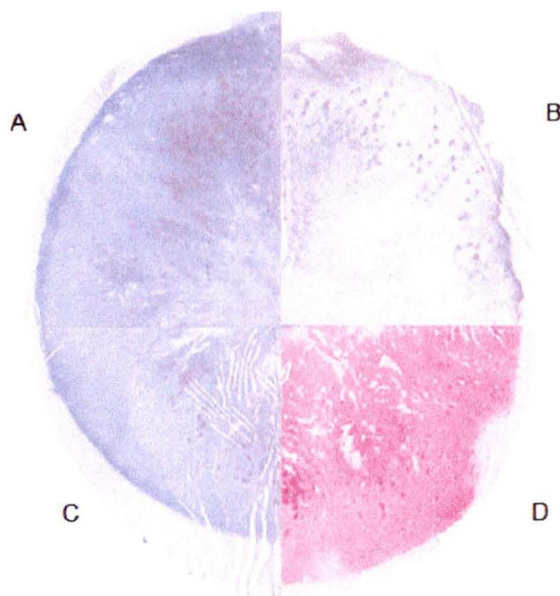


Figure 37 : Immunolocalisation de l'UDP-glucose-déshydrogénase dans la racine de chicorée. Marquage de « tissue prints » avec un polysérum de lapin anti- UDP-glucose-déshydrogénase purifié par passage sur colonne protéine-A sepharose et révélation avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dilué 5.000 x.

A : Ac anti-UDP-glucose-déshydrogénase (2,6 mg/ml) dilués 10.000 x

B : Contrôle sans Ac anti- UDP-glucose-déshydrogénase.

C : Ac anti-UDP-glucose-déshydrogénase dilués 10.000 x + 200 µl de protéine UDP-glucose-déshydrogénase purifiée (soit 1,1 µg de protéines)

D : Rouge Ponceau pour vérifier le transfert des protéines vers la membrane PVDF.

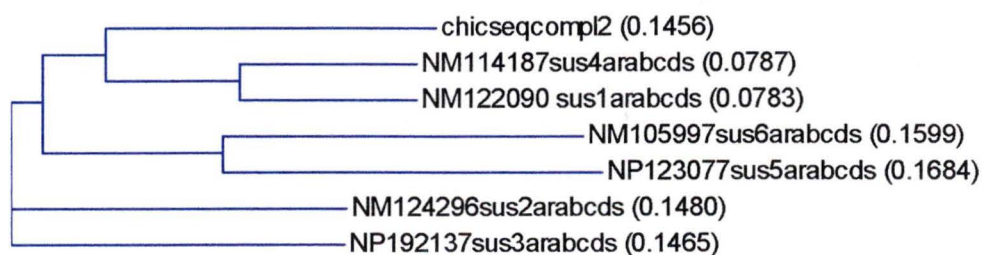


Figure 38 : Dendrogramme montrant la proximité de la séquence nucléotidique de la SuSy de chicorée avec les isoformes SUS 1 et SUS 4 d'*Arabidopsis*.

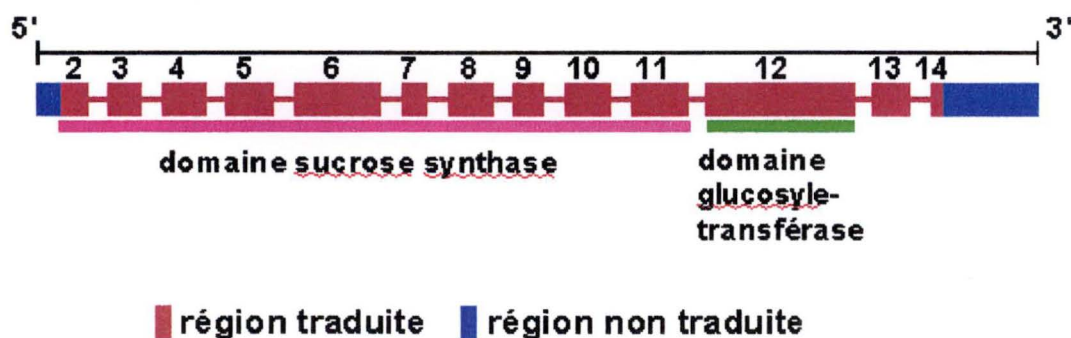


Figure 39: Organisation théorique du gène de la sucrose synthase de racine de chicorée, déterminée par analogie avec celle du gène AtSUS1 (Baud *et al.* 2004). Les boîtes brunes numérotées correspondent à des exons et les traits les reliant sont des introns. Les domaines sucrose synthase et glucosyle-transférase de la protéine sont indiqués.

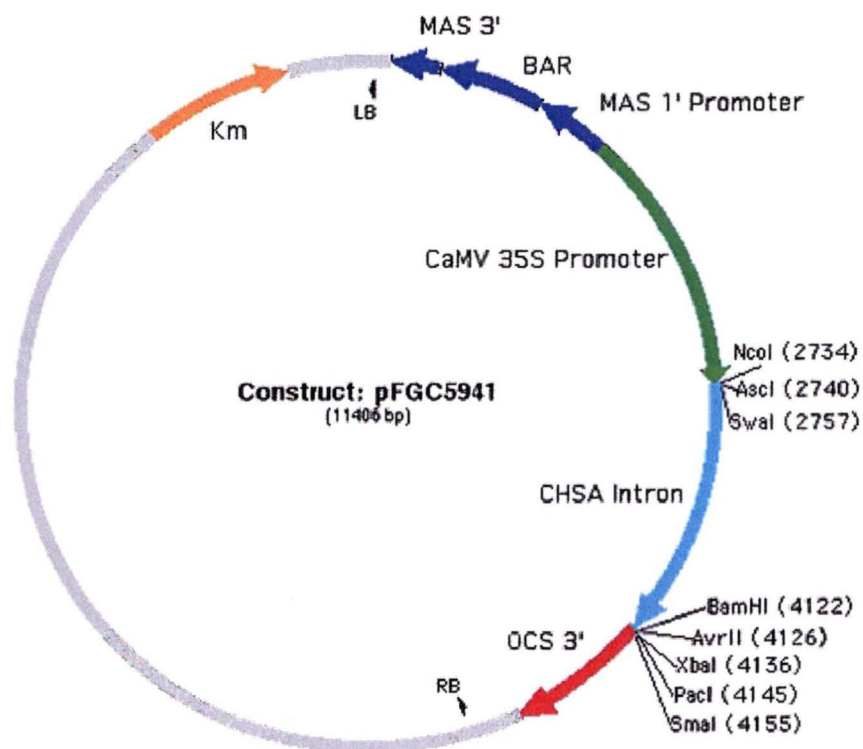


Figure 40 : Vecteur pFGC 5941 adapté pour la réalisation de construction ARNi.

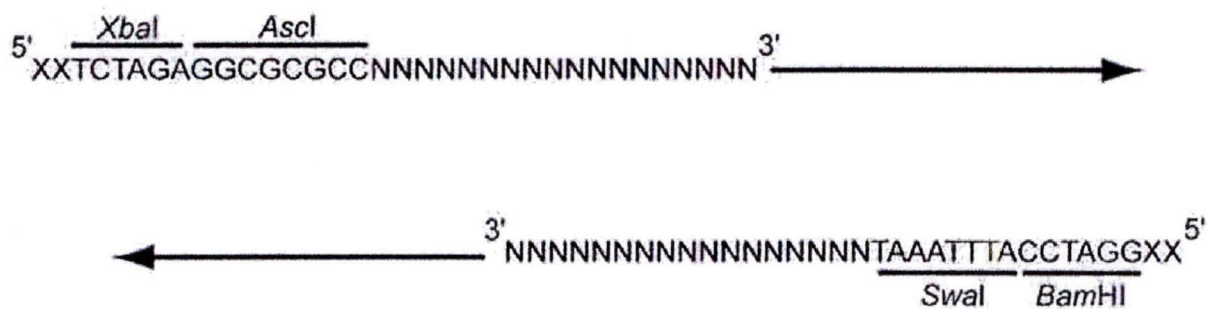


Figure 41 : Schéma général des amorces utilisées pour l'amplification du fragment RNAi

Différentes dilutions de l'anticorps anti- UDP-glucose déshydrogénase purifié ont été utilisées pour le marquage de « tissue-prints » de racine de chicorée. Un résultat optimal a été obtenu pour une dilution 10.000 x de cet anticorps (Figure 37 A). Différentes quantités de protéine UDP-glucose déshydrogénase recombinante purifiée ont été mises à incuber avec les anticorps anti-UDP-glucose déshydrogénase de manière à vérifier la spécificité du marquage. Quelles que soient les quantités de protéines purifiées ajoutées, nous ne sommes pas parvenus à une extinction significative du signal (Figure 37 C). Ainsi, le marquage réalisé avec les anticorps mis en contact avec leur antigène cible est sensiblement le même que celui obtenu suite à l'utilisation des anticorps non pré-incubés.

III. Biologie Moléculaire

En parallèle à la localisation de la sucrose synthase dans la racine de chicorée, nous avons tenté de réaliser une construction ARNi, dirigée contre une SuSy présente dans la racine de chicorée dont la séquence complète a été obtenue au laboratoire. En effet, le criblage d'une banque d'expression de racine de chicorée construite au laboratoire (Projet Pectinet financé par la Région Wallonne) à l'aide d'un polysérum dirigé contre une isoforme de sucrose synthase d'*A. thaliana* (SUS1) exprimée en bactéries a permis d'isoler un clone contenant la séquence nucléotidique complète codant pour une isoforme de SuSy. Ce clone a été séquencé au laboratoire. La séquence codante de 2.424 pb fournit une protéine de 808 acides aminés, caractérisée par un PM théorique de 92,2 kDa et un PI théorique de 6,1. Cette séquence présente une homologie de 51,9 à 72,1 % avec les six isoformes de SuSy d'*A. thaliana*. Elle est particulièrement proche des isoformes AtSUS1 et AtSUS4 avec lesquelles elle partage respectivement 70,7 et 72,1 % d'identité (Figure 38). La séquence théorique en acides aminés de la protéine de chicorée présente les deux domaines typiques de l'organisation des sucrose synthases, à savoir un domaine sucrose synthase et un domaine glucosyl-transférase (Figure 39). Plusieurs séquences consensus de type RXXS, reconnues par des Ser/Thr protéines kinases, sont présentes du côté de l'extrémité N-terminale de la protéine.

Une construction ARNi sera utilisée pour transformer des cellules végétales. Dans ces cellules, cette structure ARNi sera transcrite en ARN, ce qui provoquera alors l'inhibition des ARN présents dans les cellules et ayant une homologie de >90% avec l'ARN transcrit à partir de la construction ; ceci par la technique de l'ARN interférence (Brantl S., 2002).

III.1 Construction d'ARN interférent.

Pour réaliser cette construction ARNi, nous avons utilisé un vecteur distribué par l'ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center (<http://www.arabidopsis.org/>) sous le numéro CD3-447): le vecteur pFGC 5941. Ce vecteur possède différents sites de restriction qui permettent l'insertion du fragment ARNi en sens et en antisens (Figure 40). La stratégie de clonage d'une séquence d'intérêt dans ce vecteur est basée sur la présence de deux sites de restriction (XbaI et AscI en 5', SwaI et BamHI en 3') dans chacune des amorces utilisées pour l'amplification de cette séquence d'intérêt (Figure 41). Ainsi, lors des amplifications de la séquence cible, ces sites de restriction, présents dans les amorces, seront introduits dans la séquence du fragment d'intérêt. Ceci permettra le clivage ultérieur de cette séquence d'intérêt en générant des extrémités compatibles, nécessaires pour mener à bien le clonage de ce

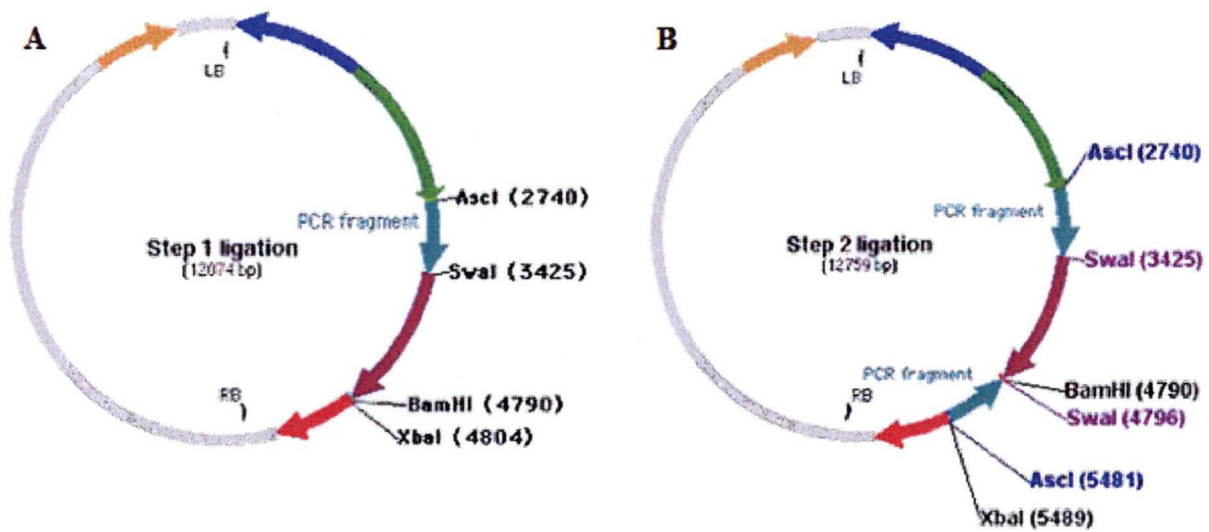


Figure 42 : Figure illustrant le mécanisme de clonage en deux étapes. (A) Clonage du fragment d'intérêt en sens, grâce aux enzymes AscI et SmaI. (B) Utilisation des enzymes BamHI et XbaI pour cloner le fragment en antisens.

Y16091sus2daucusstart (564) GATGCTAAACACAGAGITCAACACAGTAAATGGTCTTCAAGATATCTTGAGGATAGCAGGGGAATATCTTTCTAACTCCATCAGACACACCATACTCT
X75332sus1daucusstart (582) GATGCTGAACACACAGAGITCAAGATGTAATGGTCTTCAATCTATGCTGAGGAAAGCTGGGGATATCTCTCTACACTACATCAGACACACCTTACTCT
X70990start (582) GATGCTGAGTGAAGAAATCAAAACCTCAACACCTTCAACACACCTTGAAGAAAGCTGAGGAGATATCTAGCAGAGCTTAAGCCCGAAACCTGTATGAA
X69773viciafabastart (576) GATGTTGAATGACAGAAITCAAAACCTGATTTCTTCAACATGTCTGAGGAAAGCTGAGAGATATCTAAGCAGGGTTGATCTGAACTCCATACTCG
U24088sus3solatubstart (576) GATGCTAAATGATAGAAITCAAGATTTGTATCTCTTCAAAAGTCTGAGGAGAGCTGAGGAAATACCTCACCACCTTTCCCTAGAACCTCATACTCG
U24087sus4solatubstart (576) GATGCTGAATGATAGGATACAGAAITCGAATAGCTTCAAAATGCTCTAAGGAGGACAGAGGATACCTCATTATGCTTCCCTCCAGATCTCCATATTTC
NP192137sus3arabstart (582) GATGTTGAATGATGAGATCAAGAGATATCTTAGGCTTCAAAATCGAGTATGAAAGGACAGAGATATATCTCTATAGCTTTCAAGAACTCCGTTCTCG
NP123077sus5arabstart (561) TATGATGAATGAGACTCTTAACAGGCTAGAAAGCTTGAGATGAGTTGATTTTGACAGATGTTTCTATCGAGCTGCCTAAGGACACACCTTTCCAA
NM124296sus2arabstart (573) GATGCTGAATGATGAGATACAGATATATCCCATACTCTGAGGAGCTTTGGCAGAGCAGAGGAGTCTCTTCTAACTTCTCTGCGACACCATACTCT
NM122090sus1arabstart (582) GATGTTGAGGAGAGAGATTCAGAACTCAACCTCTGCAACACACCTTGAGGAAAGCAGAGAGATATCTAGCAGAGCTTAAGTCCGAACACTGTATGAA
NM14187sus4arabstart (582) GATGCTTACATAGGATCCAGAACTCAACACCTTACACACATCTGAGAAAGCAGAGGATATCTAATGAGCTGAAGCTGAGACACTCTACTCA
NM105997sus6arabstart (594) CATGATCAATGAGGATCTCAACAGGTTGCAAGAGCTCCAGAAATCTCTCATGCTTCTGCTGATTGTTCTCTGACTTACTCAAAACACACACCTTATGAA
L19762sus1lycostart (573) GATGCTTAATGACAGATCCAAACCTGAATCTCTTCAAGCTGTGTTAAGGAGGATCAGAGTACCTATCGACACTCGATGCGGCTACTGCCATACTCT
Consensus provisoire 10-03-04 (576) GATGCTGAATGATAGAAITCAGAAITTTGTATCTCTCCAAAAGTCTGAGGAGGCCGAGGATACCTCACCACCTTTCCGACAGAACTTCATACTCC
AJ011319sus2lycostart (601) GATGCTGAATGA AGAATTC A A T AATCTCTCAA A T CTGAGGAAAGCAGAGGATATCT C A GCTT C CC GAAC CCACTACTC
Consensus 701 800

Y16091sus2daucusstart (664) GATTTTGACACAGTTCACAGAGTTGGTTTGAAGGGGGTGGGGTGAACCTCTGAGCATGTTCTGAAATGTTTCATATGCTTCTGATCTCTCTTG
X75332sus1daucusstart (682) GAAITTGACACAGTTCACAGAGTTGGTTTGAAGGGGGTGGGGTGAACCTCTGAGCATGTTCTGAAATGTTTCATATGCTTCTGATCTCTCTTG
X70990start (682) GAGTTTGAGGCAAGTTTGAAGAGATTTGGTCTTGAAGGGGGTGGGGGACAAATCGAGAGGTGTCTTACATGATAGCTCTCTTCTTGGACCTTCTTG
X69773viciafabastart (676) GAAITTGACACAGTTCACAGAGTTGGTTTGAAGGGGGTGGGGGACAGCGGAGAGGTGTCTCTGAGTCCATTCAGCTTCTCTTGATCTCTTG
U24088sus3solatubstart (676) GCAITTGACACAGTTCACAGAAITTTGGCTTGAAGGGGGTGGGGTGAACCGGAGAGGTGTCTTACAGATGATCTGATGCTCTCTGATCTCTTG
U24087sus4solatubstart (676) GAAITTGACACAGTTCACAGAAITCGGATTTGAAGGGGGTGGGGGACAGCGGAGAGGTGTCTTACAGATGATAGCTCTCTTCTTGGACCTTCTTG
NP192137sus3arabstart (682) GAAITTCGAATACGGTTCACAGGATTTGGTTTGAAGAGGATGGGGGACAGCGGAGAGTCTTGAATGATGCAITCTCTCTCTGATCTCTTG
NP123077sus5arabstart (661) GCTTTGCACTCAGGTTAAGGAAITGGTTTGAAGAGGATGGGGGACAGCGGAGAGTAAAGGAGCAATGAGAACTTGTGGGAGATCTCTTG
NM124296sus2arabstart (673) GAAITTCGAATTTGACATACAGGATTTGGATTTGAAGGGGGTGGGGTGAACCGGAGAGGTGTCTTACAGATGATCTGATGCTCTCTGATCTCTTG
NM122090sus1arabstart (682) GAGTTTGAGGCAAGTTTGAAGAGATTTGGTCTTGAAGGGGGTGGGGGACAAATCGAGAGGTGTCTTACATGATAGCTCTCTTCTTGGACCTTCTTG
NM14187sus4arabstart (682) GATTTTGACACAGTTCACAGAGATTTGGTCTTGAAGAGGCTGGGGGACAGCGGAGAGGTGTCTTACATGATAGCTCTCTCTGATCTCTTG
NP105997sus6arabstart (694) ACTTTTGACACAGGTTGAAGGAGATGGATTCGAAGAGGTTGGGGGATCAGAGAGAGCTGAAGGAAACAAATGATTATCTTTTCAAGATCTCTTG
L19762sus1lycostart (676) GAAITTCGACACAGTTCACAGAAITCGGATTTGAAGGGGGTGGGGGACAGCGGAGAGGTGTCTTACAGATGATGATGATGCTCTCTGATCTCTTG
Consensus provisoire 10-03-04 (673) GAAITTCGACATAGTTCAAGAGATTCGATTCGACAGAGTTGGGGTGAACCGGAGAGGTGTCTTACAGATGATGATGATGCTCTCTGATCTCTTG
AJ011319sus2lycostart (676) TCATTTGACACAGTTCACAGAAITGGCTTGAAGAGAGTTGGGGTGAACCGGAGAGGTGTCTTACAGATGATGATGATGCTCTCTGATCTCTTG
Consensus (701) GAAITTGACACAGTTCACAGAGATTTGGTTTGAAGGGGGTGGGGGACAC GACAGAGGTGT CT GA ATGAT CGTAT CTTCGGA CTCTCTTG

Figure 43 : Alignement des extrémités N-terminales de SuSy de différentes dicotylédones avec la séquence consensus de SuSy de la chicorée. Le fragment ARNi choisi est surligné en gris.

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value
gi 29244821 gb AC125205.4 	Mus musculus BAC clone RP23-238I...	<u>36</u>	2.5
gi 25148646 ref NM_071004.2 	Caenorhabditis elegans putativ...	<u>36</u>	9.7
gi 28436752 gb BC047103.1 	Homo sapiens hypothetical protei...	<u>36</u>	9.7
gi 30257731 gb AE017034.1 	Bacillus anthracis str. Ames sec...	<u>36</u>	9.7
gi 24195703 gb AF011374.1 	Leptospira interrogans serovar l...	<u>36</u>	9.7
gi 18464002 gb AC068296.16 	Homo sapiens 3 BAC RP11-496B10 ...	<u>36</u>	9.7
gi 18677665 gb AC108072.3 	Homo sapiens BAC clone RP11-704A...	<u>36</u>	9.7
gi 7140432 gb AC024869.1 	Caenorhabditis elegans cosmid Y75...	<u>36</u>	9.7
gi 13625496 gb AC079833.4 	Homo sapiens BAC clone CTD-2170K...	<u>36</u>	9.7
gi 10862832 emb AL109931.18 HSDJ719K3	Human DNA sequence fr...	<u>36</u>	9.7
gi 5828616 emb AL113997.1 CNSO1BAT	Botrytis cinerea strain ...	<u>36</u>	9.7
gi 5832077 emb AL116861.1 CNSO1DID	Botrytis cinerea strain ...	<u>36</u>	9.7

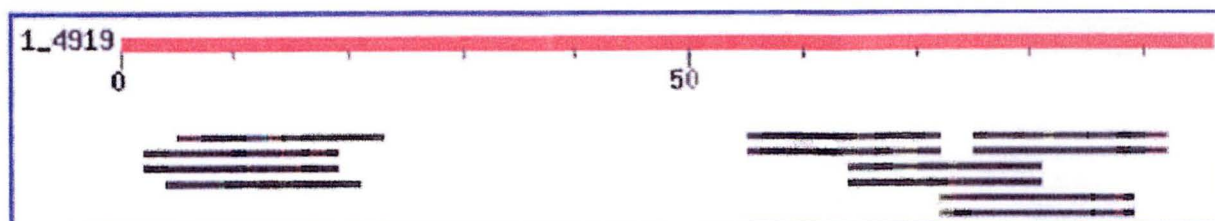


Figure 44 : Résultat du Blast effectué pour vérifier que la séquence choisie ne se trouvait pas dans d'autres protéines végétales. Ce Blast a relevé 12 protéines potentielles, toutes d'origine animale et avec un E value trop élevé.

fragment dans le vecteur lui aussi clivé par ces mêmes enzymes. Ainsi, dans une première étape, tant le vecteur que le fragment cible amplifié par PCR seront clivés par le couple d'enzymes AscI et SmaI, de façon à cloner une première fois cette séquence dans le vecteur (Figure 42, A). Dans la deuxième étape, la séquence sera clonée en sens inverse après avoir été clivée par les enzymes XbaI et BamHI, de même que le vecteur obtenu après la première étape de clonage (Figure 42, B). Nous obtiendrons donc, au terme de cette seconde étape, deux copies de la séquence cible, clonées en sens inverse et séparées par un intron de 1.352 pb. Une fois transcrite dans la cellule, cette construction donnera lieu à une conformation de type épingle à cheveux (hairpin). L'intron, formant la boucle de cette structure sera épissé au cours de la maturation de l'ARN messager, ce qui aura pour conséquence la formation de l'ARN double brin nécessaire au mécanisme ARN interférent.

Le vecteur pFGC 5941 contient également le bord gauche et le bord droit essentiels à la transformation des cellules végétales via la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Après la transformation de ces bactéries, le vecteur est clivé au niveau de ces bords droit et gauche par des protéines VIR, spécifiques d'*A. tumefaciens*. L'ADN compris entre ces deux bords est alors transporté dans la plante via un canal formé par des protéines de la bactérie ; il sera ensuite intégré dans le génôme de la cellule végétale par le bord droit.

Enfin, ce vecteur comprend la séquence d'un gène de résistance à la kanamycine, servant à la sélection des bactéries transformées avec cette construction ainsi qu'un gène de résistance à l'herbicide Basta (BAR), pour la sélection des cellules végétales transformées.

III.1.1 Choix du fragment à insérer dans la construction ARN interférent.

Le fragment à insérer dans la construction ARNi a été choisi en effectuant des alignements des extrémités N-terminales de SuSy de différentes dicotylédones avec la séquence consensus de SuSy de la racine de chicorée (Figure 43). Dans cet alignement, nous avons ciblé une zone peu conservée, ceci dans la perspective de viser plus particulièrement la séquence SuSy isolée au départ de la racine de la chicorée. Nous n'avions en effet aucune indication quant à l'existence d'autres isoformes que celle ciblée dans la racine de chicorée. Sachant que l'extinction ARNi s'effectue quand il y a une homologie d'au moins 70% entre l'ARN transcrit à partir de la construction et l'ARN cible (Brantl S. 2002), nous avons comparé la séquence de SuSy de chicorée dont nous disposons, avec chacune de ces séquences, dans le but de s'assurer que la construction ARNi n'éteindrait que l'isoforme ciblée. Nous avons observé une homologie d'environ 58% entre la sucrose synthase de chicorée et celles choisies dans notre alignement.

Nous avons ensuite recherché les siRNA susceptibles d'éteindre le gène SuSy ciblé, en nous basant sur le programme Ambion (http://www.ambion.com/technlib/misc/silencer_siRNA_template.html). Ceci nous a permis de définir une séquence d'environ 90 pb pour la construction ARNi ; cette séquence contenait 4 siRNA potentiels selon le programme Ambion. Nous avons également effectué une analyse Blast pour vérifier que la séquence choisie ne se trouvait pas dans d'autres protéines végétales, potentiellement présentes chez la chicorée, ce qui aurait eu pour conséquence d'éteindre les gènes codant pour ces protéines, ce que nous ne souhaitons évidemment pas. Ce Blast a relevé 12 protéines potentielles mais toutes étaient d'origine animale et leur valeur E était trop élevée pour être pris en compte (la valeur idéale de E value étant de 10^{-x} avec une valeur de x élevée pour avoir une corrélation importante) (Figure 44).

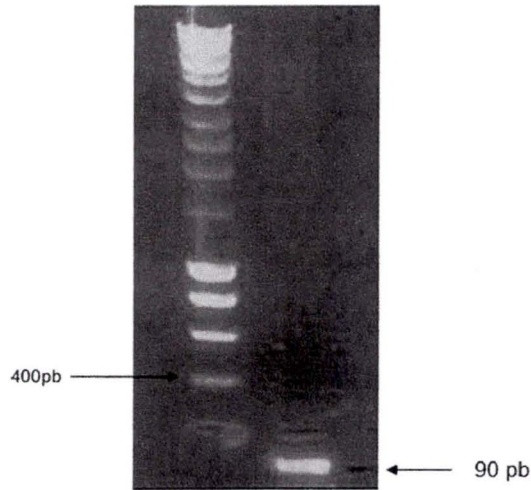


Figure 45 : Vérification sur gel d'agarose 1% de l'amplification par PCR du fragment SS RNAi 90 pb réalisée au départ d'une mini-prep du vecteur Pbsk⁺-séquencée à l'aide des amorces SS RNAi FOR et SS RNAi.

The map of the linearized vector, pCR[®]II, is shown below. The sequence of the multiple cloning site is shown with a PCR product inserted by TA Cloning[®]. The arrows indicate the start of transcription for the T7 and Sp6 RNA polymerases. The complete sequence of pCR[®]II is available from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 20).

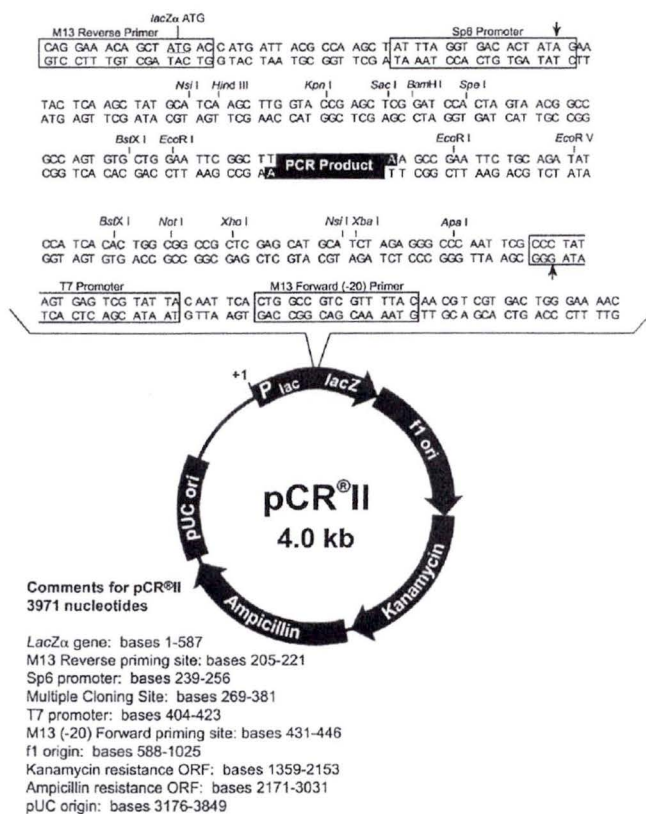


Figure 46 : Représentation schématique du vecteur pCRII utilisé pour le clonage de produits PCR.

III.1.2 Choix des amorces pour l'amplification du fragment ARNi.

Nous devons ensuite déterminer des amorces nécessaires à l'amplification du fragment ARNi SuSy par PCR. Nous avons vérifié que le produit de 90 pb ne contenait aucun des sites de restriction des enzymes utilisées pour son clonage en sens et en antisens dans le vecteur pFGC 5941 de façon à pouvoir contrôler la bonne intégration des produits PCR sans les cliver. La détermination de ces amorces a été faite à l'aide du logiciel « Oligo 4.0 ». Elles ont été fournies par Eurogentec.

Les séquences de ces amorces sont présentées ci-dessous.

SSRNAFOR : 5'-AC**T-CTA-GA****G-GCG-CGC-C**CA-AGC-TGT-GTT-AAG-AAA-GGC-3',
XbaIAseI

SSRNAREV : 5'AC**G-GAT-CC****A-TTT-AAA-T**GGA-TCT-CTT-GAA-ACT-TAT-GTG-CG-3'
BamHISwaI

Les séquences encadrées correspondent aux séquences des sites de restriction des enzymes utilisées pour le clonage des fragments dans le plasmide.

III.1.3 Amplification du fragment ARNi et clonage dans le vecteur pCRII.

La séquence nucléotidique cible, SS ARNi a donc été amplifiée par PCR au départ d'ADN d'une miniprep du vecteur pBSK⁺-SuSyChic disponible au laboratoire, en utilisant les amorces décrites précédemment. Le produit PCR a été purifié, après une vérification sur gel d'agarose 1% (Figure 45), par le système Microcon-Millipore, en vue du clonage dans le vecteur pCRII (Invitrogen). L'efficacité de la purification a été vérifiée sur un gel d'agarose 1% (non montré). La concentration de l'ADN purifié a été estimée à environ 15 ng/μl.

Le « TA Cloning Kit » (Invitrogen) fournit une stratégie rapide et en une seule étape pour la ligation d'un produit PCR dans un plasmide. Le principe est le suivant : la Taq polymérase ajoute des désoxyadénosines à l'extrémité 3' des produits PCR. Dans le kit TA, le vecteur pCRII est muni des extrémités désoxythymidines correspondantes en 3' (Figure 46). Ceci permet le clonage efficace du produit PCR dans le vecteur pCRII.

Des bactéries compétentes « TOP10F one shot » (Invitrogen) ont ensuite été transformées par choc thermique avec le mélange de ligation pCRII-SS ARNi et sélectionnées après une nuit à 37°C sur milieu contenant de l'ampicilline; du X-gal et de l'IPTG permettant la sélection des colonies positives par un test blanc-bleu lacZ. Pour rappel, ce test est une méthode de sélection de bactéries transformées, basé sur la propriété de complémentarité intragénique qu'ont les bactéries suite à la transformation. La souche bactérienne utilisée est déficiente en β -galactosidase. Elle ne possède qu'une partie de la séquence de la β -galactosidase codant pour la région C-terminale inactive α' . La partie N-terminale inactive α est, elle, codée par une portion de gène portée par le vecteur pCRII. Il y a donc complémentarité intragénique ou α -complémentarité dans les bactéries transformées avec le vecteur pCRII : les peptides α et α' fournissent ainsi une galactosidase fonctionnelle.

Le site multiple de clonage du vecteur pCRII est intégré dans le gène lac Z. Si le vecteur ne contient pas d'insert, le phénomène de complémentarité intragénique peut se faire

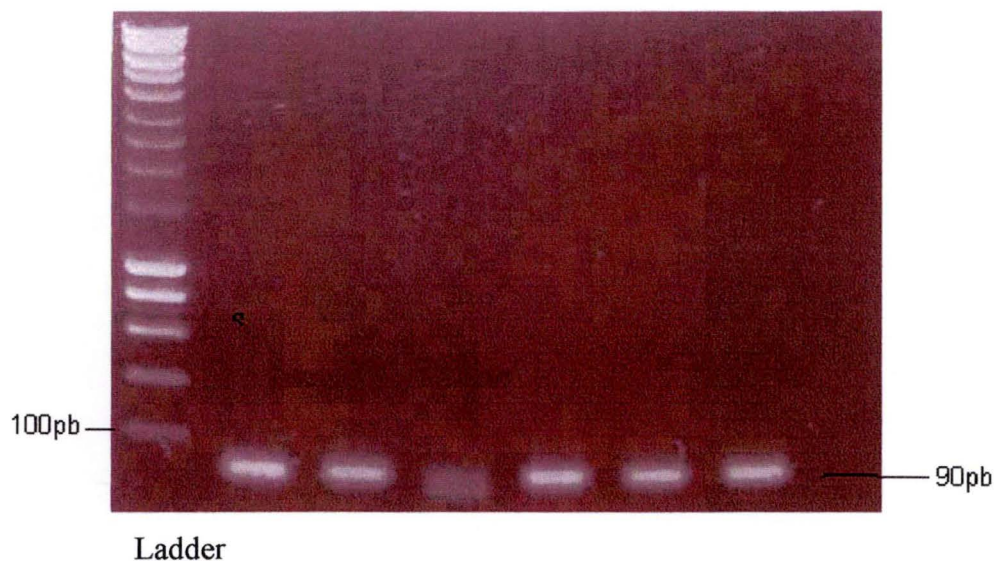
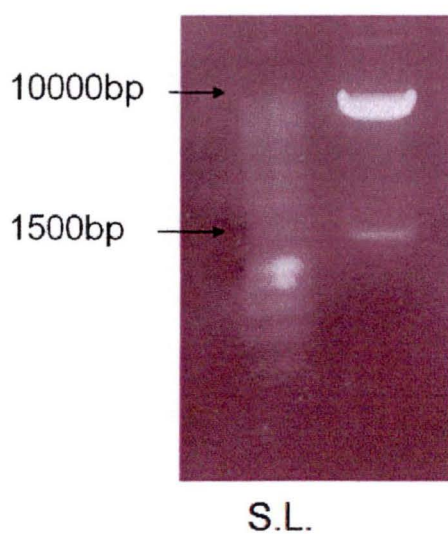


Figure 47 : Vérification de la PCR sur les colonies transformées avec le vecteur PCRII contenant le fragment RNAi. La PCR a été réalisée avec les amorces spécifiques du fragment RNAi. Gel agarose 1%. S.L. Ladder 100 pb

A



B

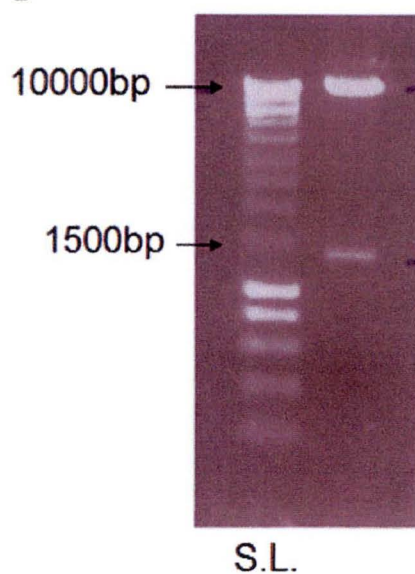


Figure 48 : Restrictions vérificatives du vecteur pFGC5941 avec les enzymes (A) AscI et BamHI et (B) XbaI et SmaI. Dans les deux cas, on observe bien la bande à environ 10.041 bpb qui correspond au vecteur et la bande d'environ 1.365 pb qui correspond à l'intron Chalcone synthase. Gel d'agarose 1%. S.L. : smart ladder.

et ainsi fournir une activité galactosidase. Par contre, si le vecteur contient le fragment ARNi, la région codant pour la partie N-terminale de la β -galactosidase est non-fonctionnelle et la complémentation est alors rendue impossible car le peptide α ne peut s'associer au peptide α' de la bactérie pour former une β -galactosidase fonctionnelle. L'activité de cette enzyme peut être observée en plaçant dans le milieu de culture du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside) qui est un substrat de la β -galactosidase. Le X-gal est donc dégradé par cette enzyme, ce qui forme un composé bleu appelé produit X (5-bromo-4-chloro-indolyl).

En présence d'IPTG, qui est un inducteur de l'opéron lactose dont fait partie le gène de la β -galactosidase, et de X-gal dans le milieu de culture, les bactéries transformées avec des vecteurs refermés sur eux-mêmes apparaîtront bleues tandis que chez les bactéries transformées avec le vecteur contenant l'insert, la β -galactosidase n'est pas fonctionnelle et ces colonies apparaîtront donc blanches.

Nous avons prélevé six des colonies blanches et avons réalisé des PCR au départ de ces bactéries transformées, en utilisant les amorces spécifiques SS ARNi FOR et SS ARNi REV permettant de vérifier la présence du fragment SS ARNi dans le vecteur pCRII. L'analyse sur gel d'agarose des produits PCR est présentée à la figure 47. Celui-ci confirmait la présence d'un vecteur pCRII-SS ARNi dans 5 colonies sur 6.

III.1.4 Restrictions vérificatives du vecteur pFGC5941

La première étape a été de mettre en culture les bactéries *E. coli* DH5 α contenant le plasmide pFGC 5941 reçues de l'ABRC dans le milieu sélectif adéquat. Une miniprep de ce vecteur nous a ensuite permis de préparer un stock de ce plasmide nécessaire pour les manipulations ultérieures.

Afin de nous assurer du bon état du plasmide pFGC 5941, nous avons testé les différentes enzymes de restriction dont les sites sont présents sur le vecteur. Les restrictions par AscI et BamHI d'une part et par XbaI et SmaI d'autre part ont permis d'extraire un fragment d'environ 1.300 pb, comme le montrent les figures 48A et B. Le vecteur a ensuite été clivé par les enzymes AscI et SmaI pour le préparer à l'insertion du fragment SSARNi sens (Figure 49).

Nous devons ensuite retirer le fragment ARNi cloné dans le vecteur pCRII afin de le liguer dans le vecteur pFGC5941. Une restriction du vecteur pCRII-SSARNi a donc été effectuée avec les enzymes AscI et SmaI afin de sous-cloner le fragment ARNi en sens dans le plasmide pFGC5941. L'analyse sur gel d'agarose du produit de restriction n'a pas permis de mettre en évidence la séparation de l'insert du vecteur. Différentes restrictions ont été effectuées afin de vérifier le bon fonctionnement des enzymes : le clivage de la construction pCRII-SSARNi par SmaI et AscI utilisées séparément a bien permis de linéariser le vecteur (non montré).

Trois paramètres pouvaient être mis en cause : l'efficacité des enzymes, le rapport ADN plasmidique/ADN du fragment ARNi et la durée de la restriction. Nous avons par la suite envisagé l'hypothèse que l'absence d'insert visible sur gel lors de la restriction de pCRII-SSARNi par AscI et SmaI était peut-être due à la différence de quantité d'ADN entre le vecteur et l'insert. La différence de taille entre le vecteur pCRII (3.971 pb) et l'insert (90 pb) est telle que la quantité d'ADN correspondant au fragment d'intérêt est négligeable par rapport à la quantité d'ADN correspondant au vecteur pCRII. L'ADN du fragment ARNi contenu dans l'échantillon clivé serait peut-être tellement faible qu'il ne pourrait être observé.

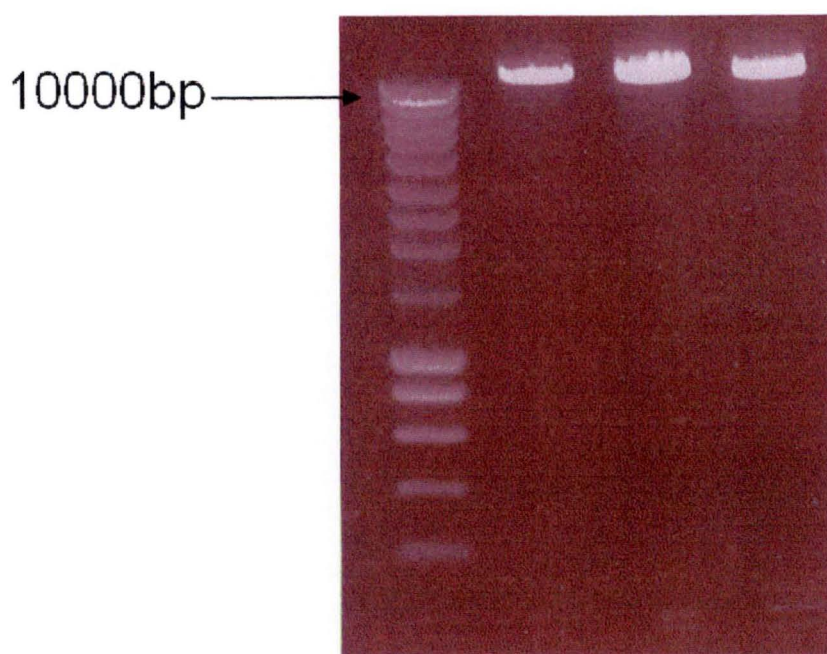


Figure 49 : Restriction préparative du vecteur pFGC5941 avec les enzymes *AscI* et *SwaI* en vue du clonage des fragments ARNi SuSy dans le sens 5'-3'. Gel agarose 1%.

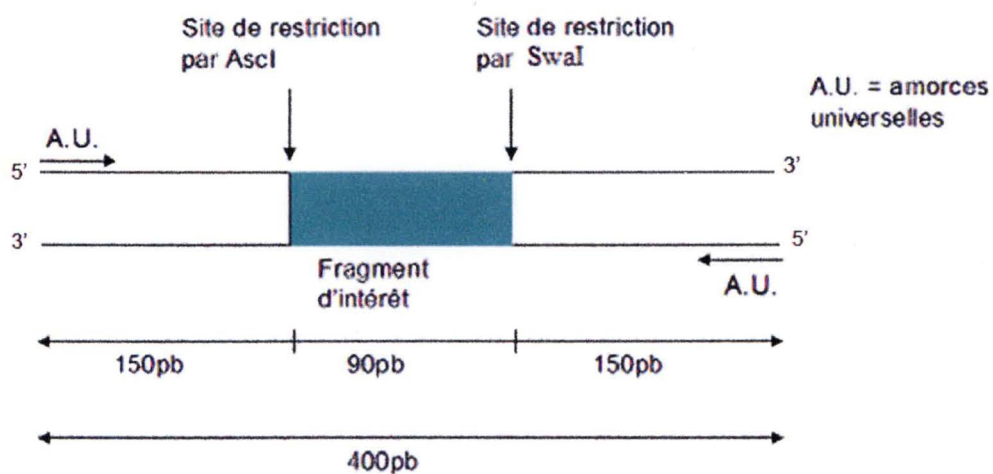


Figure 50 : Schéma du fragment obtenu après amplification par PCR en utilisant les amorces universelles, spécifiques du vecteur pCRII.

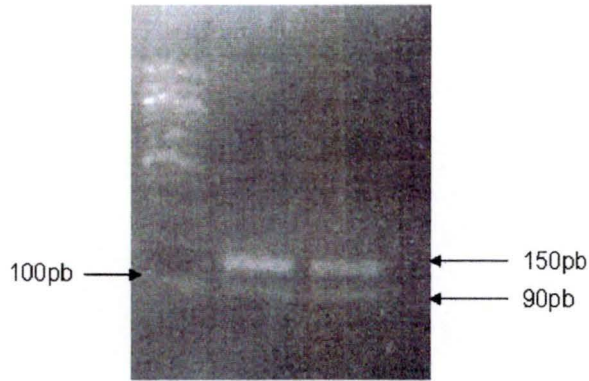


Figure 51 : Excision du fragment SSARNi par restriction par les enzymes AscI et SwaI des produits PCR obtenus par amplification avec les amorces universelles au départ d'une miniprep du vecteur pCRII-SSARNi. Gel Separide Gel Matrix 2% et 100 bp ladder (NEB).

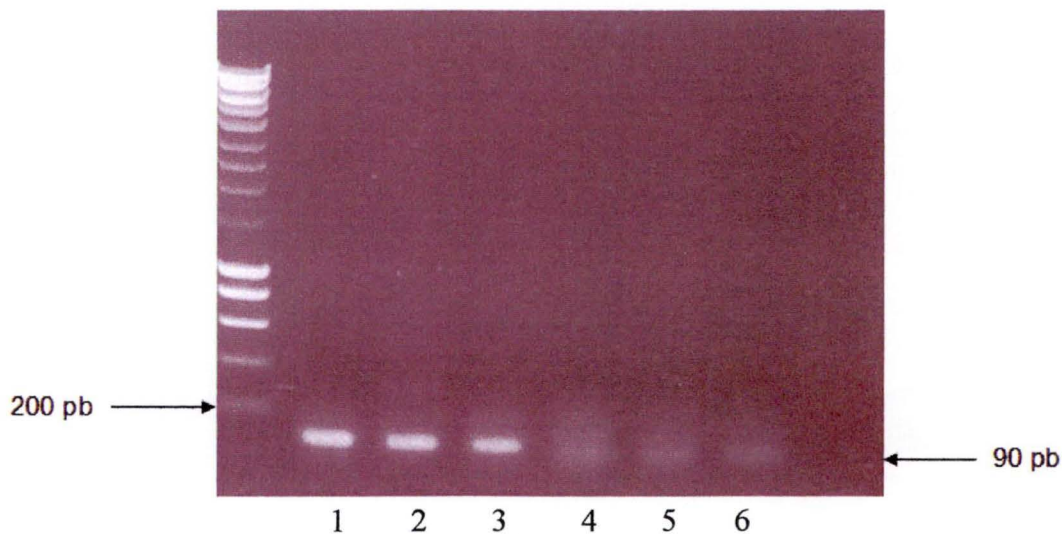


Figure 52 : Vérification de la PCR sur les colonies transformées avec le produit de ligation pFGC5941-SSARNi. La PCR a été réalisée avec les amorces spécifiques du fragment RNAi. Gel d'agarose 1%.

1 : colonie obtenue après transformation avec le produit de ligation pFGC5941-SSARNi.
 2 : contrôle positif : vecteur pCRII-SSARNi
 3-4-5 et 6 : colonies obtenues après transformation avec le produit de ligation du vecteur pFGC5941 sans insert.

Pour vérifier cette possibilité, nous avons utilisé des amorces universelles, spécifiques du vecteur pCRII et complémentaires de séquences situées à une distance limitée du site multiple de clonage, pour amplifier une zone du vecteur pCRII-SSARNi d'environ 400 pb correspondant à la séquence du fragment d'intérêt flanquée de séquences bordantes. Une restriction de ce produit PCR permet donc en quelque sorte d'homogénéiser les tailles des fragments clivés (figure 50).

Comme le montre la figure 50, la restriction par le couple d'enzymes AscI et SmaI génère des fragments de 150 pb situés en amont et en aval du fragment d'intérêt ainsi qu'un fragment de 90 pb correspondant à l'insert cible. Une bande à 150 pb, sur le gel de vérification de la restriction de ce fragment de 400 pb par les enzymes AscI et SmaI, correspondait à nos attentes mais une bande à 250pb semblait signifier qu'une des deux enzymes n'avait pas clivé. De fait, les enzymes utilisées séparément donnaient le même profil que celui obtenu après le clivage par les deux enzymes. Nous en avons donc conclu que la restriction de ce produit PCR de 400 pb avec les enzymes SmaI et AscI pendant une heure n'était pas suffisante pour obtenir le produit de 90 pb en quantité suffisante, des bandes à ± 150 et ± 250 pb étant observées majoritairement (non montré). Après plusieurs essais, nous avons établi que les conditions optimales de préparation de cet insert de 90 pb au départ du produit PCR nécessitaient (a) une purification du produit PCR sur colonnes Microcon (Millipore) pour enlever les sels du mélange PCR pouvant interférer avec la restriction par les enzymes, (b) une restriction de deux heures à 37°C, (c) une séparation des produits clivés sur gel Separide (Gibco-BRL) adapté à la séparation de petits fragments.

La figure 51 montre l'obtention de deux bandes distinctes, d'un PM correspondant respectivement à 150 pb et 90 pb. Nous avons découpé la bande inférieure correspondant au fragment ARNi de 90pb et ce dernier a été purifié par passage sur colonne « Ultrafree DA » (Millipore) du morceau d'agarose solubilisé, suivi d'une extraction phénol/chloroforme de l'éluat et d'une précipitation de l'ADN après ajout d'ARNt, par acétate de Na/éthanol.

L'efficacité de la purification sur colonne a ensuite été contrôlée à l'aide d'un Separide Gel Matrix 2% (non-montré). La bande à 90pb était cette fois nettement visible.

Le fragment ARNi a été ligué dans le vecteur pFGC5941 grâce au kit « Quick ligation » (NEB). Deux μ l du produit de ligation ont été utilisés après 30 minutes de réaction à 25°C pour la transformation de bactéries Top10F. Le reste du produit de ligation a ensuite été replacé à 16°C pendant une nuit pour être utilisé pour une seconde transformation de bactéries Top10F. Suite à cette seconde transformation, des colonies ont poussé sur un milieu de sélection contenant de la kanamycine. Des colonies ont également été observées sur les boîtes contrôles pour lesquelles la ligation avait été effectuée sur le vecteur pFGC5941 clivé seul. Une amplification par PCR sur chacune des colonies a été réalisée avec les amorces spécifiques du fragment ARNi SS-ARNiFOR et SS-ARNiREV pour vérifier la présence de celui-ci dans l'ADN des bactéries. Nous avons ensuite vérifié ces produits PCR sur un gel d'agarose 1% (Figure 52), ce qui nous a permis d'observer une amplification sur une des colonies positives. Une miniprep a été effectuée sur ces bactéries de façon à préparer un stock de plasmide pFGC5941 SS-ARNi sens nécessaire d'une part aux restrictions permettant la vérification du clonage du fragment cible en sens et d'autre part pour préparer le vecteur à recevoir le second fragment en sens inverse. Des restrictions vérificatives permettant de confirmer la présence de l'insert dans le vecteur ont également été effectuées : (a) le clivage par AscI et BamHI visant à retirer un fragment de ± 1.440 pb correspondant à l'intron et au

fragment cible de 90 pb, (b) le clivage par EcoRI, dont les sites sont présents à la fois dans l'insert et dans le vecteur, permettant de retirer un fragment de ± 1470 pb. Aucune de ces restrictions n'ayant permis de retirer un fragment du vecteur, nous en avons conclu que le produit PCR obtenu par amplification était probablement un artefact.

Ceci termine la présentation de nos résultats.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

IV. DISCUSSION

La sucrose synthase (SuSy) est une enzyme qui catalyse, de manière réversible, la dégradation du saccharose selon la réaction suivante : **Saccharose + UDP \leftrightarrow UDP-glucose + fructose** (Bologa *et al.*, 2003).

Une activité importante de cette enzyme est observée au niveau des organes hétérotrophes tels que les racines, les fruits et les jeunes feuilles. La SuSy a surtout été localisée au niveau des cellules compagnes des vaisseaux du phloème qui approvisionnent les organes consommateurs en saccharose. Différents rôles sont attribués à la SuSy au niveau de ces organes. Ainsi, la sucrose synthase est associée (a) à la synthèse d'amidon, notamment chez le pois et le maïs (Liao et Wang, 2003), (b) au développement et au fonctionnement des nodules chez les espèces végétales de type légumineuses (Röhrig *et al.*, 2002), et (c) à la mobilisation du sucrose vacuolaire (Etxeberria et Gonzalez, 2003). La SuSy, qu'elle soit sous forme soluble ou associée à la membrane, fournit également l'UDP-glucose, précurseur diphosphonucléosidique de base pour la synthèse des polysaccharides de la matrice pariétale : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines. Dans ce dernier cas, une autre enzyme, l'UDP-glucose déshydrogénase, intervient pour convertir l'UDP-glucose en UDP-acide glucuronique, précurseur largement utilisé pour la synthèse des pectines.

Le sucrose est un élément essentiel du métabolisme des végétaux. Il constitue, avec l'amidon, le sucre de réserve le plus connu accumulé dans les végétaux supérieurs. Par contre, chez certaines espèces, ce sont des fructanes qui sont stockés, et plus particulièrement l'inuline dans le cas de la chicorée (*Cichorium intybus*). Chez cette dernière, contrairement aux cas des espèces accumulant de l'amidon ou du saccharose, la sucrose synthase n'a pas encore, jusqu'à présent, fait l'objet de recherches très approfondies. C'est pourquoi notre laboratoire s'est intéressé à cette enzyme et plus particulièrement à son rôle dans les racines de chicorée. L'abondance de SuSy dans des extraits protéiques préparés à partir de la racine de chicorée a été démontrée par Western blots avec, en parallèle, la présence dans ces mêmes extraits d'une forte activité SuSy dans le sens de la dégradation du saccharose (Liners *et al.*, 2003). Ces résultats nous ont amenés à formuler, dans le cadre du mémoire d'Alexandre Daems (2002), l'hypothèse d'une possible implication de la SuSy dans la synthèse d'inuline et à proposer un modèle alternatif pour cette synthèse où la SuSy fournirait directement le fructose nécessaire à l'allongement des chaînes d'inuline selon un processus nettement plus avantageux pour le végétal sur le plan énergétique.

C'est dans ce contexte que s'est inscrit notre mémoire dont l'objectif était de contribuer à l'étude du rôle de la SuSy dans la racine de chicorée d'une part, en localisant cette enzyme *in situ* à l'aide d'un polysérum dirigé contre une forme recombinante de SuSy d'*Arabidopsis thaliana* et d'autre part, en générant une construction ARN interférent dans le but d'éteindre l'expression de la SuSy de chicorée ainsi ciblée.

La localisation de Susy dans la racine de chicorée a été réalisée par immunomarquages de « tissue-prints » à l'aide d'un anticorps primaire spécifique, le polysérum de lapin dirigé contre une forme recombinante de SuSy d'*Arabidopsis thaliana* (projet Plantech, Région Wallonne) et d'un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline. Différentes mises au point des dilutions des anticorps primaires et secondaires ainsi que de la molarité en NaCl du tampon TBS utilisé lors des incubations et des lavages des « tissue-prints » ont été effectuées. La spécificité des marquages observés a également été vérifiée par pré-incubation du

polysérum avec de la SuSy recombinante que nous avons produite et purifiée dans ce but. Aucun marquage n'a été obtenu suite à cette pré-incubation des anticorps primaires.

Le marquage de « tissue-prints » a permis de mettre en évidence que la localisation de la SuSy n'est pas restreinte aux régions des faisceaux conducteurs, comme il l'a été rapporté chez différentes espèces, telles que le maïs et le citron (Nolte et Koch, 1993) ou encore le radis (Rouhier et Usuda, 2001), mais est observée sur toute la surface de la racine de chicorée. Ce résultat nous amène donc à proposer que, dans le cas de la racine de chicorée, la SuSy interviendrait également dans des processus autres que le déchargement du phloème. Aucune information n'est jusqu'à présent disponible dans la littérature sur l'existence de cellules spécialisées dans la synthèse de l'inuline. Il a par contre été prouvé que cette synthèse d'inuline avait lieu dans la vacuole de toutes cellules de la racine de chicorée (Van Laere et Van den Ende, 2002). Le marquage homogène que nous avons obtenu constitue dès lors un élément de poids allant dans le sens du modèle proposé au laboratoire selon lequel la SuSy serait impliquée dans la synthèse d'inuline.

Parallèlement à la localisation de la sucrose synthase, nous nous sommes intéressés à la localisation de l'UDP-glucose déshydrogénase, enzyme plus particulièrement impliquée dans la synthèse des pectines. Des « tissue-prints » ont été marqués avec un polysérum dirigé contre une forme recombinante d'UDP-glucose déshydrogénase d'*Arabidopsis thaliana*. Comme dans le cas de la SuSy, nous avons observé une localisation de l'UDP-glucose déshydrogénase dans tous les tissus de la racine de chicorée. Toutefois, la pré-incubation des anticorps avec différentes quantités d'UDP-glucose déshydrogénase recombinante que nous avons produite et purifiée dans ce but n'a pas permis d'abolir le marquage des « tissue prints ». Ce résultat pourrait s'expliquer de deux manières : soit la concentration des différents échantillons de protéines recombinantes purifiées était trop faible pour permettre l'inhibition de tous les anticorps spécifiques mis en présence, soit le polysérum utilisé contient, en plus des anticorps spécifiques dirigés contre l'UDP-glucose déshydrogénase, des anticorps dirigés contre *E. coli*, source de réactions croisées importantes. La préparation de nouveaux stocks plus concentrés d'UDP-glucose déshydrogénase purifiée d'une part, et l'ajout d'une étape supplémentaire de pré-incubation des polysérums avec des *E. coli* d'autre part, permettraient de vérifier ces hypothèses.

Nos essais de localisation de SuSy en immunofluorescence n'ayant pas fonctionné, nous ne pouvons apporter aucun renseignement supplémentaire quant à la localisation de la sucrose synthase au niveau des différents tissus ou cellules de la racine. Cette lacune pourrait probablement être comblée par la modification de différents paramètres intervenant dans les étapes de préparation des tissus pour l'immunolocalisation. Les conditions de fixation ne semblent cependant pas nécessiter de modification étant donné qu'elles ont été préalablement testées dans le contexte du marquage de « tissue-prints » et que, dans ce cas, nous avons constaté une bonne persistance de la reconnaissance de la SuSy par les anticorps spécifiques. Nous pourrions par contre modifier le paramètre « résine ». En effet, dans nos expériences, une résine hydrophile de type LR White a été utilisée. Sa polymérisation a été réalisée pendant 6 heures à 60°C et il est possible que cette température ait interféré avec le marquage en modifiant par exemple l'antigénicité des SuSy cibles. En effet, nous avons pu mettre en évidence un marquage plus faible quand la fixation des « tissue-prints » avait été réalisée à 25°C plutôt qu'à 4°C. Des températures trop élevées pourraient donc avoir des effets délétères sur les sites antigéniques de la SuSy et, en conséquence, sur le marquage observé avec le polysérum. Ainsi, une alternative pourrait être de polymériser la résine LR White à froid, en initiant cette polymérisation sous UV. Une autre possibilité serait d'effectuer des coupes à

froid puis de les fixer à 4°C, comme les « tissu-prints », avant de procéder au marquage immunologique.

Ensuite, un fluorochrome caractérisé par une autre longueur d'onde d'émission pourrait être utilisé de manière à pouvoir différencier plus facilement d'une part, le marquage fluorescent dû à l'anticorps secondaire et d'autre part, l'autofluorescence des tissus. Nous avons en effet révélé la reconnaissance de la SuSy de la racine de chicorée par le polysérum de lapin, en utilisant un anticorps secondaire couplé au fluorochrome « Alexa 488 » (Molecular Probes). La fluorescence émise suite à l'excitation de celui-ci a été mesurée entre 510 et 550 nm. Or, nous avons pu mettre en évidence l'importante autofluorescence des tissus quand ils sont observés dans ces mêmes conditions. L'utilisation d'un fluorochrome émettant dans une autre partie du spectre, tel l'« Alexa 594 » qui émet dans le rouge (entre 620 et 700 nm), permettrait peut-être de mieux discriminer le signal spécifique du bruit de fond dû à cette autofluorescence.

Le deuxième objectif de ce travail consistait en la génération d'une construction ARNi de manière à abolir l'expression de SuSy dans la racine de chicorée et de vérifier l'impact de l'absence de SuSy sur la synthèse d'inuline de chicorées transgéniques. Des alignements de la séquence nucléotidique de racine de chicorée clonée au laboratoire (Projet Pectinet, Région Wallonne) avec des séquences de SuSy présentes dans les banques de données ont permis d'identifier une zone de faible homologie au sein de laquelle nous avons plus particulièrement ciblé une zone de 90 pb à intégrer dans une construction ARNi. Cette dernière a été amplifiée par PCR au départ d'une miniprep du clone pBSK⁺-SuSy chic en utilisant des amorces spécifiques flanquées à leurs extrémités de sites de restriction permettant son sous-clonage dans le vecteur pFGC5941 utilisé pour la construction ARNi. Cette séquence amplifiée a été clonée dans le vecteur pCRII adapté pour le clonage de produits PCR. Des restrictions avec les enzymes AscI et SmaI ont été effectuées sur un amplicon de ~400 pb résultant de l'amplification de l'insert cloné dans le vecteur pCRII à l'aide des amorces universelles. Cette stratégie est la seule qui s'est avérée être efficace pour l'obtention de matériel en quantité suffisante pour le sous-clonage.

Les résultats contradictoires obtenus en matière d'analyse PCR et de restrictions vérificatives du clone résultant de la transformation de bactéries TOP10 avec le produit de ligation pFGC5941-SSRNAi ne nous ont pas permis de conclure à la réussite du sous-clonage de la séquence de 90 pb dans le vecteur pFGC5941. Dans ce contexte, il serait intéressant de disposer d'amorces spécifiques du vecteur pFGC5941, dont l'une serait complémentaire de l'extrémité 3' de la séquence du promoteur 35S (situé en amont du site de clonage de la séquence cible) et l'autre serait complémentaire de l'extrémité 5' de la séquence de l'intron chalcone synthase (situé en aval du site de clonage de la séquence cible). Ces amorces permettraient de vérifier la présence de vecteurs recombinants par PCR et de confronter ces résultats avec ceux obtenus en utilisant les amorces spécifiques de l'insert. La poursuite des manipulations de biologie moléculaire de manière à obtenir la construction ARNi est le principal objectif du travail à réaliser suite à ce mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

V. BIBLIOGRAPHIE

- **Albrecht G. et Mustroph A. (2003)**
Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. *Planta* **217** 252-260
- **Atanassova R., Leterrier M., Gaillard C., Agasse A., Sagot E., Coutos-Thévenot P., Delrot S. (2003)**
Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape *Plant Physiology* **131**, 326-334.
- **Baroja- Fernández E., Muñoz F.J., Saikusa T., Rodríguez-López M., Akazawa T., Pozuet-Romero J. (2003)**
Sucrose synthase catalyses the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiology* **44** 500-509.
- **Baud S., Vaultier MN., Rochat C. (2004)**
Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **55** (396), 397-409.
- **Bologa K., Fernie A., Leisse A., Loureiro M. et Geigenberger P. (2003)**
A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiology* **132**, 2058-2072.
- **Brangeon J., Nguyen-Quoc B., Lecharny A. (1996)**
Ultrastructure detection of sucrose synthase distribution in developing maize leaves. *Protoplasma* **192**, 150-158
- **Brantl S. (2002)**
Antisense-RNA regulation and RNA interference *Biochimica et Biophysica Acta* **1575** 15-25
- **Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (2000)**
Biochemistry and molecular biology of plants. American society of plant physiologist edition, 630-669.
- **Carlson SJ., Chourey PS., Helentjaris T., Datta R. (2002)**
Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase(SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene. *Plant Molecular Biology* **49**, 15-29
- **Chourey P.S. (1981)**
Genetic control of sucrose synthase in maize endosperm. *Molecular Gen. Genet.* **184** 372-376
- **Chourey P.S. et Nelson O.E. (1976)**
The enzymatic deficiency conditioned by the *shrunk-1* mutations in maize. *Biochemical Genetic* **14** 1041-1054
- **Chen WL., Huang DJ., Liu PH., Wang HL., Su JC. et Lee PD. (2001)**
Purification and characterization of sucrose phosphate synthase from sweet potato tuberous roots. *Bot.Bull Acad Sin* **42**: 123-129

- **Chengappa S., Guilleroux M., Phillips W., Shields R. (1999)**
Transgenic tomato plants with decreased sucrose synthase are unaltered in starch and sugar accumulation in the fruit.
Plant Molecular Biology **40** 213-221
- **Chourey PS., Taliercio EW., Carlson SJ., Ruan YL. (1998)**
Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis.
Mol Gen Genet **259** 88-96
- **Crespi M., Zabaleta E., Pontis R. et Salerno G. (1991)**
Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat.
Plant physiology **96** 887-891
- **Daems A., (2002)**
Allocation du carbone entre les polysaccharides pariétaux et de réserve chez les végétaux : détection immunologique de la sucrose synthase et de l'ADP-glucose pyrophosphorylase chez *Cichorium intybus L.*
Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licenciés en sciences biologiques.
- **Druart N., De Roover J., Van Den Hende W., Goupil P., Van Laere A., Rambour S. (2001)**
Sucrose assimilation during early stages of chicory (*Cichorium intybus L.*) plants.
Planta **212**, 436-443
- **Echeverria E. (2000)**
Vesicle-mediated solute transport between the vacuole and the plasma membrane.
Plant Physiology, **123** 1217-1226
- **Echeverria E., Gonzalez PC., Brune A. (1997)**
Characterization of proton and sugar transport at the tonoplast of sweet lime (*Citrus limmetioides*) juice cells.
Physiologia plantarum **101**, 291-300.
- **Etcheberria E. et Gonzalez P. (2003)**
Evidence for a tonoplast-associated form of sucrose synthase and its potential involvement in sucrose mobilization from the vacuole.
Journal of Experimental Botany **54** (386), 1407-1414.
- **Etcheberria (2004)**
Sucrose.
Encyclopedia of Plant and Crop Sciences (2004)
- **Fernández**
- **Foyer C., Paul M. (2001)**
Source-Sink relationships
Encyclopedia of life sciences.
- **Gordon A.; Minchin R.; James C.; Komina O. (1999)**
Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation
Plant Physiology **120** 867-877.
- **Haigler C., Datcheva M.; Hogan P.; Salnikov V.; Hwang S.; Martin K.; Delmer D. (2001)**
Cellulose partitioning to cellulose synthesis.
Plant Molecular Biology **47** 29-51.
- **Hardin S., Tang GQ., Scholz A., Holtgraewe D., Winter H. et Huber S. (2003)**
Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as

signal for proteolysis.

The Plant Journal **35**, 588-603.

- **Klotz K., Finger F.L., Shelver W.L.** (2003)
Characterization of two sucrose synthase isoforms in sugarbeet root.
Plant Physiology and Biochemistry **41** 107-115
- **Kraemer G., Kohrs D., Alberte R.** (1998)
Developmental changes of sucrose synthase activity and abundance in root and leaf of *Zostera marina*.
Aquatic Botany **62**, 189-198
- **Kutschera U. et Heiderich A.** (2002)
Sucrose metabolism and cellulose biosynthesis in sunflower hypocotyls.
Physiologia Plantarum **114**, 372-379.
- **Koch K.** (1992)
Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes.
The Plant Cell, **4** 59-69.
- **Koch K.** (2004)
Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development.
Current Opinion in Plant Biology, **7**, 235-246
- **Komatsu A.; Moriguchi T.; Koyama K.; Omura M.; Akihama T.** (2002)
Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggest different roles and phylogenetic relationships.
Journal of experimental Botany, **53** n°366 61-71
- **Konishi T., Ohmiya Y., Hayashi T** (2004)
Evidence that sucrose synthase loaded into the phloem of a poplar leaf is used directly by sucrose synthase associated with various β -glucan synthases in the stem.
Plant Physiology, **134**, 1146-1152
- **Li C.R.; Zhang X.B.; Hew C.S.** (2003)
Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium Goldiana*.
Physiologia Plantarum **118**, 352-360.
- **Liao Y. et Wang A.** (2003)
Sugar-modulated gene expression of sucrose synthase in suspension-cultured cells of rice.
Physiologia Plantarum **118**, 319-327
- **Marana C., Olmedo F. et Carbonero P.** (1990)
Differential expression of the two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light.
Gene, **88** 167-172.
- **Liners F., Schaus J-M., Van Mellaert F., Daems A., Benet C., Van Cutsem P.** (2003)
Sucrose synthase and carbon partitioning in chicory.
Compte rendu des Journées du Réseau Français des Parois.
- **Martin T., Frommer W., Salanoubat M., Willmitzer L.** (1993)
Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs.
The Plant Journal **4**(2), 367-377.
- **Nakai T., Konishi T., Zhang X-Q., Chollet R., Tonouchi N., Tsuchida T., Yoshinaga F., Mori H., Sakai F. et Hayashi T.** (1998)

An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by *in vitro* phosphorylation or directed mutagenesis of Ser¹¹.
Plant cell physiology **39**(12), 1337-1341

- **Nolte K., Koch K.** (1993)
Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading.
Plant Physiology, **101** 899-905
- **Read S., Bacic T.** (2002)
Prime time for cellulose.
Science **295** 59-60.
- **Röhrig H., Schmidt J., Miklashevichs E., Schell J., John M.** (2002)
Soybean ENOD40 encodes two peptides that bind to sucrose synthase.
PNAS **99** 1915-1920
- **Römer U., Schrader H., Günther N., Nettelstroth N., Frommer W. et Elling L.** (2004)
Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase 1 from *Solanum tuberosum* L. for carbohydrates engineering.
- **Rouhier H., Usuda H.** (2001)
Spatial and temporal distribution of sucrose synthase in the Radish hypocotyls in relation to thickening growth.
Plant Cell Physiology **42**(6) 583-593
Journal of Biotechnology **107**, 135-149
- **Ruan YL., Llewellyn DJ., Furbank RT.** (2003)
Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fibers cell initiation, elongation, and seed development.
The Plant Cell, **15** 952-964
- **Run Li C., Zhang B., Sin Hew C.** (2003)
Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium Goldiana*
Physiologia Plantarum **118** 352-360
- **Santoiani C.S., Tognetti J.A., Pontis H.G., Salerno G.L.** 1993
Sucrose and fructans metabolism in wheat roots at chilling temperatures.
Physiologia Plantarum **87** 84-88
- **Sebkova V., Unger C., Hardegger M., Sturm A.** 1995
Biochemical, physiological and molecular characterization of sucrose synthase from *Daucus carota*.
Plant physiology **108**, 75-83
- **Sturm et Tang** 1999
The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning.
Trends in plant science **4** n°10, 401-407
- **Subbaiah CC., Sachs MM.** (2001)
Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localisation precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedlings
Plant Physiology **125**(2), 585-594.
- **Tanase K. et Yamaki S.** (2000)
Purification and characterization of two sucrose synthase isoforms from Japanese pear fruit.
Plant cell physiology **41**(4), 408-414.

- **Van Laere A., Van den Ende W. (2002)**
Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system
Plant, Cell and Environment **25** 803-813
- **Vijn I., Smeekens S. (1999)**
Fructan: more Than a reserve Carbohydrate?
Plant Physiology, **120** 351-359
- **Wächter R., Langhans M., Aloni R., Götz S., Weilmünster A., Koops A., Temguia L., Mistrik I., Pavlovkin J., Rascher U., Schwalm K., Koch K., Ullrich C (2003)**
Vascularization, hugh-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*.
Plant Physiology, **133** 1024-1037
- **Wang F., Smith AG., Brenner ML. (1994)**
Temporal and spatial expression pattern of sucrose synthase during tomato fruit development.
Plant physiology **104**, 535-540.
- **Wittich P.E. et Vreugdenhil D. (1998)**
Localization of sucrose synthase activity in developing maize kernels by in situ enzyme histochemistry. *Journal of Experimental Botany* **49**, 1163-1171.
- **Zeng Y., Wu Y., Avigne W., Koch K. (1998)**
Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses.
Plant physiology **116**, 1573-1583.
- **Zrenner R., Salanoubat M., Willmitzer L., Sonnewald U. (1995)**
Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.)
The Plant Journal **7** 97-107.